

Université de Sherbrooke

**Analyse de l'influence de la chromatine du locus des gènes de l'ARN ribosomal sur la
réparation des dommages causés par les rayons UV chez *Saccharomyces cerevisiae***

Par

Maxime Tremblay

Département de microbiologie et infectiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiæ doctor (Ph.D.)
en microbiologie

Sherbrooke, Québec, Canada

Janvier 2013

Membres du jury d'évaluation

Antonio Conconi, département de microbiologie et infectiologie

Louis-Charles Fortier, département de microbiologie et infectiologie

Guylain Boissonneault, département de biochimie

Mahmoud Rouabhia, faculté de médecine dentaire, Université Laval



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-96343-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-96343-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Analyse de l'influence de la chromatine du locus des gènes de l'ARN ribosomal sur la réparation des dommages causés par les rayons UV chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Par

Maxime Tremblay

Département de microbiologie et infectiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de philosophiæ doctor (Ph.D.) en microbiologie,
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

RÉSUMÉ

La réparation par excision de nucléotides (NER) retire une grande variété de lésions à l'ADN. Elle s'opère grâce à la participation de plusieurs complexes multi-protéiques afin d'identifier et de réparer l'ADN endommagé dans divers contextes de chromatine et domaines nucléaires. Le nucléole est le domaine le plus transcriptionnellement actif et contient les gènes de l'ARN ribosomal, nécessaires à la formation de ribosomes fonctionnels. La structure de la chromatine particulière de ce locus, où des gènes d'ARN ribosomal ouverts et fermés coexistent, permet d'analyser l'impact de l'accessibilité aux dommages sur l'efficacité de la réparation par la NER.

Les travaux présentés dans cette thèse ont initialement analysés le rôle des gènes *RAD4* et *RAD34*, pendant la NER dans les gènes ouverts et fermés de l'ADNr. Il a été observé que *RAD4* est essentiel pour la réparation globale du génome dans ce locus. À l'inverse, *RAD34* n'est nécessaire que pour la réparation couplée à la transcription des gènes de l'ARN ribosomal. En somme, malgré que ces deux protéines partagent des homologies de séquences, leurs rôles dans le processus de la NER au niveau du locus de l'ADNr sont distincts et complémentaires. La somme des observations de ce travail fournit des preuves que l'ADNr ouvert est réparé plus rapidement que l'ADNr fermé, ce qui implique qu'une forme ouverte de chromatine peut favoriser la réparation NER *in vivo*. Par la suite, l'impact des dommages sur la transcription par la polymérase à ARN I (pARN-I) fut aussi analysé afin de définir le destin de ces polymérases suite à la rencontre d'un dommage. En fait, des travaux *in vitro* tendaient à démontrer que la pARN-I est bloquée à un site de dommage de façon très stable. Les travaux de cette thèse démontrent, par diverses techniques, qu'*in vivo*, la pARN-I tombe suite à la rencontre d'une lésion et est dégradée. Finalement, l'étude de l'impact de l'acétylation des histones sur l'efficacité de la réparation par la NER en utilisant le locus de l'ADNr comme modèle fut entamée. En fait, il a été postulé que l'acétylation des histones permettrait un déplacement des nucléosomes de la région endommagée afin d'initier la NER. En augmentant l'acétylation des histones dans l'ADNr, grâce à la délétion du gène *SIR2*, cette hypothèse fut analysée.

Mots clés : ADNr, réparation par excision de nucléotides, *Saccharomyces cerevisiae*, *RAD4*, *RAD16*, *RAD34*, polymérase à ARN I, acétylation

Analysis of *Saccharomyces cerevisiae*'s ribosomal RNA genes chromatin influence on the repair of UV damages

By

Maxime Tremblay

Département de microbiologie et infectiologie

Thesis presented to the Faculté de médecine et des sciences de la santé for the
obtention of the title of philosophiæ doctor (Ph.D.) in microbiology,
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

SUMMARY

Nucleotide excision repair (NER) repairs a plethora of DNA damages. Multiple protein complexes will concurrently participate to correctly identify and repair damaged DNA in various chromatin and subnuclear domains. The nucleolus is the most transcriptionnally active domains and contains the ribosomal RNA genes (rRNA), which are necessary for the ribosome biogenesis. The particular chromatin structure of this domain, where open and closed rRNA genes coexists, renders the analysis of the accessibility of DNA damages on the NER efficiency possible.

The work presented in this thesis initially studied the roles of the *RAD4* and *RAD34* genes during NER in open and closed rRNA genes. It was observed that *RAD4* is essential to the global genome repair of the locus. Inversely, *RAD34* is essential for the transcription-coupled repair of the rRNA genes only. In brief, even though these proteins share sequence homologies, their roles in the NER process is distinct and complementary. The sum of these observations yield proofs that the open rRNA genes are repaired more rapidly than the closed rRNA genes, implying that an open chromatin structure may favour NER repair *in vivo*. Subsequently, the impact of damages on the transcription by RNA polymerase I (RNAP-I) was also analysed in order to ascertain the fate of these polymerases after encountering damages. Previously, *in vitro* work seemed to demonstrate that the RNAP-I was stably blocked at a damage site. However, the work presented herein, demonstrate *in vivo* that the RNAP-I falls and is degraded upon lesion encounter. Finally, a study of the impact of histone acetylation on the efficiency of the NER using the rRNA genes locus was initiated. It was postulated that the acetylation permits nucleosome displacement from the damaged region to permit NER initiation. Thus, by increasing the histone acetylation of the rRNA genes locus, by deleting the *SIR2* gene, this hypothesis was analyzed.

Keywords : rRNA genes, nucleotide excision repair, *Saccharomyces cerevisiae*, *RAD4*, *RAD16*, *RAD34*, RNA polymerase I, acetylation

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
SUMMARY	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	X
1- INTRODUCTION	1
1.1- La levure, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2- L'ADN	2
1.2.1- Historique	2
1.2.2- Structure	4
1.3- La chromatine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.3.1- Le nucléosome, l'unité de base	6
1.3.2- La structure de la chromatine	9
1.3.3- La chromatine de l'ADN ribosomal	11
1.3.4- Rôle de la protéine Hmo1p sur l'ADN ribosomal	21
1.3.5- Les protéines SIR et leurs impacts sur l'ADN ribosomal	23
1.4- La transcription de l'ADN ribosomal	28
1.4.1- La polymérase à ARN II	29
1.4.2- La polymérase à ARN I	31
1.4.3- L'initiation de la transcription par la polymérase à ARN I	33
1.4.4- Régulation de la transcription de l'ADN ribosomal	36
1.5- Le maintien du génome	37
1.5.1- Dommages à l'ADN	38
1.5.1.1- Dommages causés par les rayons ultraviolets	41
1.5.1.2- Dommages ultraviolets et chromatine	46
1.5.1.3- Dommages ultraviolets et leurs effets sur la transcription	48
1.5.1.4- Pourquoi causer des dommages par UVC lors de nos recherches?	50
1.5.2- Les mécanismes de réparation de l'ADN	51
1.5.2.1- Réparation par excision de bases (BER)	51
1.5.2.2- Jonction des extrémités non-homologues et recombinaison homologue	52
1.5.2.3- Réparation des mésappariements (MMR)	54
1.5.3- La réparation des lésions induites par les UVC	54
1.5.3.1- Réparation par photoréactivation	54
1.5.3.2- Réparation par excision de nucléotides (NER)	55
1.5.3.3- Réparation globale du génome (GG-NER)	57
1.5.3.4- Réparation couplée à la transcription (TC-NER)	62
1.5.3.5- L'impact de la chromatine sur la NER	63
1.5.3.6- Un mécanisme conservé de la levure à l'humain	63
1.6- Hypothèses et objectifs	65
CHAPITRE 1 : Rôles complémentaires de <i>RAD4</i> et de <i>RAD34</i> dans la réparation par excision de	
nucléotides de l'ADN ribosomal actif et inactif chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
2.1- Avant-propos	66
2.2- Résumé	68

2.3- Article 1 : Complementary roles of yeast Rad4p and Rad34p in nucleotide excision repair of active and inactive rRNA gene chromatin	69
CHAPITRE 2 : Les lésions causées par le rayonnement UVC causent la chute de l'ARN polymérase I et une formation de nucléosomes sur l'ADN ribosomal	101
2.1- Avant-propos	101
2.2- Résumé	103
2.3- Article 2 : UV light induced DNA lesions cause dissociation of yeast RNA polymerase-I and inactivation of rRNA genes concomitantly to nucleosomes loading.....	104
CHAPITRE 3 : L'accessibilité au dommage par la NER chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dans le locus de l'ADN ribosomal	154
4.1- Matériel et méthode	154
4.1.1- Souches utilisées	155
4.1.2- Création des souches par transformation PCR.....	156
4.1.3- Courbes de croissance	158
4.1.4- Test de sensibilité par dilutions en séries	159
4.1.5- Courbes de réparation par la NER de l'ADN ribosomal séparé	160
4.1.6- Courbes de réparation de la région intergénique de l'ADN ribosomal.....	172
4.1.7- Évaluation de la structure de la chromatine de l'ADN ribosomal par photopontage au triméthylpsoralène.....	174
4.2- Résultats	175
4.2.1- Analyse de l'impact d'une délétion de RAD16 sur la cinétique de réparation des dommages induits par les rayons UV au niveau de l'ADNr.	175
4.2.1.1- Vérification phénotypique de la souche JS- <i>rad16Δ</i>	176
4.2.1.2- Analyse de la cinétique de réparation de l'ADNr chez la souche JS- <i>rad16Δ</i>	179
4.2.2- Analyse de l'impact d'une hyperacétylation sur la cinétique de réparation des dommages induits par les rayons UV au niveau de l'ADNr.	183
4.2.2.1- Analyse de cinétique de réparation de l'ADNr chez la souche JS343 (<i>sir2Δ</i>).....	184
4.2.2.2- Analyse de cinétique de réparation de l'ADNr chez la souche BY4741	186
4.2.2.3- Analyse de cinétique de réparation de l'ADNr chez la souche BY- <i>rad26Δ</i>	188
4.2.2.4- Analyse de cinétique de réparation de l'ADNr chez BY- <i>sir2Δ rad26Δ</i>	190
4.2.3- Analyse de l'impact de la délétion de <i>SIR2</i> sur la structure de la chromatine ..	192
4.2.4- Analyse de l'impact de la délétion de <i>SIR2</i> sur la réparation de la région intergénique de l'ADNr	194
5- DISCUSSION	196
5.1- Quel est l'impact réel des gènes <i>RAD4</i> et <i>RAD34</i> au niveau de la NER des gènes ribosomaux?	196
5.2- Qu'arrive-t-il à la polymérase à ARN I lorsqu'elle rencontre une lésion causée par les UVC?	204
5.2.1- Dissociation et dégradation de la pARN-I suite à l'induction de lésions.....	204
5.2.2- Impact du chargement de nucléosomes sur l'ADNr ouvert à partir du site du 1 ^{er} dommage sur la TC-NER.	206
5.3- L'accessibilité aux lésions est-elle favorisée dans une structure de chromatine plus ouverte?	208

5.3.1- Planification de l'analyse du rôle de <i>RAD16</i> et de l'effet de l'acétylation des histones au niveau du locus de l'ADNr.	210
5.3.2- Analyse du rôle de <i>RAD16</i> et de l'effet de l'acétylation des histones au ... niveau du locus de l'ADNr.	212
6- REMERCIEMENTS	215
7- RÉFÉRENCES	216

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1 : Composition des polymérases à ARN chez <i>S. cerevisiae</i>	29
Tableau 2 : Comparaison des protéines impliquées dans la réparation par excision de nucléotides chez l'humain et <i>S. cerevisiae</i>	64

CHAPITRE 2

Table S1 : Yeast strains used in this study.....	107
--	-----

CHAPITRE 3

Tableau 3 : Description des souches utilisées au cours de cette étude.	155
Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés pour la création des souches.....	158
Tableau 5 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de JS- <i>rad16Δ</i>	181
Tableau 6 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de JS343 (<i>sir2Δ</i>)	185
Tableau 7 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de BY4741	187
Tableau 8 : Tableau comparatif de résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr du type sauvage et de BY- <i>rad26Δ</i> au niveau du BNT fermé.	188
Tableau 9 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de BY- <i>rad26Δ</i>	189
Tableau 10 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de BY- <i>sir2Δ-rad26Δ</i>	191
Tableau 11 : Résultats de la cinétique de réparation de la RI de l'ADNr chez JS311 et JS343.....	195

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Rappel historique des découvertes importantes au niveau de la chromatine	4
Figure 2 : Structure de l'ADN	5
Figure 3 : Structure du nucléosome	8
Figure 4 : Patron de modification des histones selon l'état transcriptionnel des gènes.....	8
Figure 5 : Hiérarchie de la chromatine	10
Figure 6 : Nucléoles de cellules cancéreuses	12
Figure 7 : Structure du locus de l'ADN ribosomal.....	15
Figure 8 : Caractérisation de la chromatine des gènes de l'ARNr.....	17
Figure 9 : Effet de la réduction de la taille du locus de l'ADNr sur la sensibilité aux agents mutagènes	18
Figure 10 : Modèle expliquant la formation et le maintien de l'état de la chromatine dans le locus de l'ADNr	20
Figure 11 : Sir2p inhibe la transcription des sites E-pro.....	25
Figure 12 : Recombinaison de l'ADNr.....	27
Figure 13 : Perte de copies d'ADNr lors d'un événement de recombinaison	28
Figure 14 : Effet de la transcription par la polymérase à ARN II sur les nucléosomes.....	31
Figure 15 : Structure de la polymérase à ARN I, chez <i>S. cerevisiae</i>	32
Figure 16 : Initiation de la transcription par la polymérase à ARN I chez <i>S. cerevisiae</i>	35
Figure 17 : Dommages et mécanismes de réparation	40
Figure 18 : Impacts des dommages sur le fonctionnement cellulaire.....	41
Figure 19 : Le spectre électromagnétique.....	42
Figure 20 : Formation des dommages à l'ADN suite à une exposition aux rayons UVC et UVB	43
Figure 21 : Distribution nucléosomale des CPD	47
Figure 22 : Mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN.....	52
Figure 23 : Schéma des voies de réparation par excision de nucléotides	57
Figure 24 : Modèle suggéré expliquant le remodelage de la chromatine lors de la GG-NER par le complexe Rad7/16p	61

CHAPITRE 1

Figure 1 : Repair of CPDs in the coding region of total rDNA	78
Figure 2 : Repair of individual DNA strands in the coding region of active and inactive rDNA genes	81
Figure 3 : Repair of CPDs in the intergenic spacer	84
Figure 4 : Repair of CPDs in rDNA at nucleotide resolution.....	86
Figure 5 : Repair of the transcribed strand (TS) in the coding regions of inactive and active rDNA from WT and <i>rad26Δ</i> cells.....	91

CHAPITRE 2

Figure 1 : Average CPD yields, and hotspots for CPD formation, downstream of the rDNA transcription initiation site	114
Figure 2 : Dissociation of RNAPI from UV damaged rRNA gene TS.....	116
Figure 3 : Stability of RNAPI and RNAPI pre-initiation complex after UV irradiation....	118
Figure 4 : Electron micrographs of rRNA genes taken at different times after UV	

irradiation.....	121-122
Figure 5 : Measurements of RNAPI elongation in WT and <i>rad14Δ</i> cells during NER, at the 5'-end, in the middle and at the 3'-end of rRNA gene.	124
Figure 6 : Chromatin structure of rRNA genes during NER	127-128
Figure S2 : Related to figure 6, changes of rRNA genes in chromatin after UV irradiation in the WT (RAD+) JS311 and <i>rad14Δ</i> isogenic strain	130
Figure S3 : Opening of rRNA genes in G1 arrested cells.....	131
Figure S4 : Schematic representation of the combined ChEC and psoralen crosslinking..	133
Figure 7 : Closing and re-opening of rRNA genes chromatin resulted from nucleosomes loading and unloading.....	136-137
Figure S5 : Related to figure 7, closing and re-opening of rRNA genes chromatin resulted from nucleosomes loading and unloading.	138
Figure 8 : Closing of rRNA genes chromatin in <i>rad14Δ</i> cells after UV irradiation resulted from nucleosomes loading	139-140
Figure S6 : Related to figure 8, closing of rRNA genes chromatin in <i>rad14Δ</i> cells after UV irradiation resulted from nucleosomes loading.....	141
Figure 9 : Displaced RNAPI are replaced by nucleosomes	146

CHAPITRE 3

Figure 25 : Description schématisée de la création des souches pour cette étude.....	157
Figure 26 : Schématisation de la séparation de l'ADNr ouvert et fermé.....	166
Figure 27 : Principe du photo-pontage au triméthylpsoralène pour évaluer la structure de la chromatine de l'ADNr.	175
Figure 28 : Analyses de sensibilité des souches JS311, JS- <i>rad34Δ</i> , JS- <i>rad33Δ</i> et JS- <i>rad16Δ</i> aux rayons UV	177
Figure 29 : Cinétique de réparation de l'ADNr de la souche de type sauvage JS311.	180
Figure 30 : Courbes de réparation de l'ADNr de JS- <i>rad16Δ</i>	181
Figure 31 : Courbes de réparation de l'ADNr de JS343 (<i>sir2Δ</i>)	185
Figure 32 : Courbes de réparation de l'ADNr de BY4741	187
Figure 33 : Courbes de réparation de l'ADNr de BY- <i>rad26Δ</i>	189
Figure 34 : Courbes de réparation de l'ADNr de BY- <i>sir2Δ-rad26Δ</i>	191
Figure 35 : Structure de la chromatine des gènes de l'ARNr des souches JS311 et JS343 (<i>sir2Δ</i>).....	193
Figure 36 : Courbes de réparation de la région intergénique (RI) de l'ADNr chez JS311 et JS343 (<i>sir2Δ</i>)	195

Discussion

Figure 37 : Approches potentielles d'étude de l'interaction de Rad34p avec Hmo1p pour la détection des dommages UV	201
Figure 38 : Nouveau schéma des voies de réparation par excision de nucléotides	203
Figure 39 : Dissociation rapide de la pARN-I des gènes de l'ARN ribosomal.	205
Figure 40 : Analyses de TC-NER différentielle 5' vs 3'.....	207
Figure 41 : Planification des analyses.....	211

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
 ADNr : ADN ribosomal
 ARN : Acide ribonucléique
 ARNnc : ARN non-codant
 ARNr : ARN ribosomal
 ARN_t : ARN transfert
 ARS : Origine de répllication
 BER : Réparation par excision de bases
 BT : Brin transcrit
 BNT : Brin non-transcrit
 CARA : « *Constitutive Association of Rrn3 and A43* »
 CF : « *Core factor* »
 ChEC : « *Chromatin endogenous cleavage* »
 CPD : « *Cyclobutane pyrimidine dimer* »
 DCG : Désordre congénital de la glycosylation
 DSB : Cassure double-brin, « *Double strand break* »
 ERC : Cercles extra-chromosomiques
 ETS : « *External transcribed spacer* »
 FISH : « *Fluorescence in situ hybridization* »
 FRET : « *Fluorescence resonance energy transfer* »
 GG-NER : « *Global genome nucleotide excision repair* »
 HAT : Histone acétyl-transférase
 HDAC : Histone déacétylase
 HMG : « *High mobility group* »
 HR : Recombinaison homologue
 ITS : « *Internal transcribed spacer* »
 I.R : Infrarouge
 kDa : KiloDalton (unité de mesure)
 m : Mètre
 MMEJ : Jonction médiée par micro-homologie
 MMR : Réparation des mésappariements
 MNase : Nucléase micrococcalle
 NER : « *Nucleotide Excision Repair* »
 NHEJ : Jonction des brins non-homologues
 NIB : « *Nuclei isolation buffer* »
 ORF : « *Open Reading Frame* »
 pARN-I : Polymérase à ARN I
 pARN-II : Polymérase à ARN II
 Pb : Paires de bases (unité de mesure)
 PCR : « *Polymerase chain reaction* »
 PBS : « *Phosphate buffer saline* »
 PML : « *ProMyelocytic Leukaemia* »
 Pr : Protéine ribosomales
 pT7 : Polymérase à ARN T7

RAD : « *Radiation sensitive* »
 RENT : « *Regulator of nucleolar silencing and telophase exit* »
 RFB : Barrière de la fourche de réplication, « *Replication fork barrier* »
 RPA, RPB et RPC : « *RNA polymerase A, B or C* »
 SIR : « *Silent information regulator* »
 TAR1 : « *Transcript antisense to ribosomal RNA* »
 TBP : « *TATA binding protein* »
 TC-NER : « *Transcription coupled nucleotide excision repair* »
 TE : Tris-HCl-EDTA
 TIR : Région initiatrice de la transcription, « *Transcription initiation region* »
 TPE : « *Telomere positioning effect* »
 ts : « *Temperature sensitive* »
 TTL : Transcription translésionnelle
 UAF : « *Upstream activating factor* »
 UBF : « *Upstream binding factor* »
 UV : Ultraviolet
 XP : « *Xeroderma pigmentosum* »
 YePD : « *Yeast extract peptone dextrose* »
 µM : micromètre
 ψ : Triméthylpsoralène
 6-4PP : Dimères pyrimidines (6-4) pyrimidones

1. Introduction

1.1. La levure, *Saccharomyces cerevisiae*

Peu d'organismes unicellulaires eucaryotes ont pu marquer l'histoire de l'humanité à ce point, l'importance de la souche *Saccharomyces cerevisiae* est simple à réaliser, même pour les plus néophytes : Dès l'époque des Égyptiens, et même des Sumériens avant eux, le pain et la bière étaient au menu. En effet, cette levure, même lorsqu'elle n'était pas encore observée ou même identifiée, ce qui fut effectué au 19^{ième} siècle, était d'une importance capitale à l'alimentation humaine, puisqu'elle est utilisée lors de la fermentation de la bière et du pain. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'elle est communément nommée la levure de la bière.

Au-delà des besoins alimentaires, cette levure, de par ses caractéristiques, est très utilisée en recherche. Son génome, ayant été cartographié au milieu des années 1990 (Goffeau *et al*, 1996), a permis à la communauté scientifique d'utiliser les multiples avantages (tel que les techniques moléculaires bien connues, leur croissance rapide et leur faible coût) conférés par ce modèle d'étude afin d'accélérer la création de connaissance au niveau de la biologie moléculaire.

L'utilisation de cette levure en tant que modèle d'étude pour mieux comprendre le fonctionnement de divers systèmes cellulaires permet la transposition de ces connaissances au niveau du fonctionnement des cellules humaines (Heyningen, 1997). Cette dernière est très utilisée en tant que modèle afin d'étudier des mécanismes de base, fortement conservés entre la levure et l'humain, tel que le cycle cellulaire (Harper et Elledge, 1996), le métabolisme des lipides (Petranovic *et al*, 2010), la transcription par les diverses polymérases à ARN (Huang et Maraia, 2001; Garente et Bermingham-McDonogh, 1992; Schena, 1989) ou les processus de vieillissements cellulaires (Aggarwal et Brosh, 2012).

À titre d'exemple, l'utilisation de la levure permis d'identifier et de caractériser le rôle de protéines impliquées dans le désordre congénital de la glycosylation (DCG). Le DCG provient principalement de mutations au niveau du gène *PMM2* (Matthijs *et al*, 1997a, 1997b). Le rôle et le fonctionnement de ce dernier a été identifié grâce à l'homologie de séquence du gène SEC53 de *S. cerevisiae*, modèle d'étude important au niveau des voies de glycosylation (Kepes & Schekman, 1988; Aebi & Hennet, 2001).

Finalement, ce modèle d'étude est aussi particulièrement utilisé afin d'étudier les mécanismes de réparation de l'ADN, thème de cette thèse. Chez des gens atteints de la maladie génétique *Xeroderma pigmentosum* (XP), où la réparation de l'ADN est affectée, l'identification des gènes impliqués dans l'étiologie de cette maladie et la compréhension de leur rôle fut améliorée du fait que des gènes homologues avaient préalablement été identifiés et étudiés chez la levure, *S. cerevisiae* (Prakash & Prakash, 2000; Aggarwal & Brosh, 2012). Par exemple, le gène humain XPD (« *Xeroderma pigmentosum* », groupe D) fut cloné et exprimé chez la levure où la protéine pouvait empêcher la létalité de la délétion de RAD3. Or, chez *S. cerevisiae*, il était connu que *RAD3* jouait un rôle au niveau de l'initiation de la transcription par les polymérases à ARN II en causant l'ouverture de l'ADN double-brin, l'hypothèse fut donc émise que XPD avait un rôle similaire à jouer tant lors de la réparation que lors de l'initiation de la transcription (Sung *et al*, 1993). Dans un autre cas, l'identification de *RAD14*, homologue à XPA (« *Xeroderma pigmentosum* », groupe A), permet de confirmer le rôle spécifique de XPA au niveau de la réparation par excision de nucléotide (Bankmann *et al*, 1992).

1.2. L'ADN

1.2.1 Historique

Les acides nucléiques furent initialement isolés, et donc identifiés, par les travaux de F. Miesher dans les années 1870 (figure 1). L'objectif de ses travaux consistait à tenter d'identifier les molécules de base présentes dans les organismes vivants. Comme modèle, il

utilisait les leucocytes, puisqu'il était en mesure d'en obtenir facilement de l'hôpital où il travaillait : la production de pus dans les blessures était vue, par le corps médical, comme un élément important afin de favoriser la guérison et est très riche en leucocytes (Dahm, 2008; Olins et Olins, 2003). Une fois sa matière première isolée, il développa un protocole afin d'isoler une substance, présente dans le noyau cellulaire, qu'il nomma « nucléine ». Dans ses travaux subséquents, il identifia la composition élémentaire de la substance, qui était en fait de l'acide désoxyribonucléique (ADN); carbone, hydrogène, oxygène, azote et une grande quantité de phosphore (figure 2).

Malgré ses travaux, l'ADN n'était pas encore vue comme le siège de l'information héréditaire. En fait, suite à la découverte des histones par Kossel, la communauté scientifique alimentait l'idée que des protéines, probablement les histones, étaient la source de l'information transmise par l'hérédité (Kossel, 1911; Olins et Olins, 2003). D'ailleurs, Kossel fut récompensé par l'obtention d'un prix Nobel pour ses travaux sur l'identification des bases azotées de l'ADN et des histones.

La genèse de la biologie moléculaire, qui se définit comme l'étude du fonctionnement des interactions entre les divers systèmes cellulaires, débute en 1944 avec les premières hypothèses sur l'ADN en tant que siège de l'information génétique des organismes vivants par Avery (Avery *et al.*, 1944).

Suite à ces expériences, l'intérêt pour l'ADN s'est amplifié, les scientifiques recherchant la méthode par laquelle l'information génétique pouvait être entreposée, répliquée et utilisée par la cellule. Lors de leur publication de la structure double-hélice de l'ADN, Watson et Crick ont remarqué que la structure elle-même de l'ADN suggérait une réponse à ces questions : ils émirent l'hypothèse que les brins pouvaient se dissocier afin de permettre la copie du matériel génétique à partir d'un des 2 brins matrice (Watson et Crick, 1953; Crick et Watson, 1953).

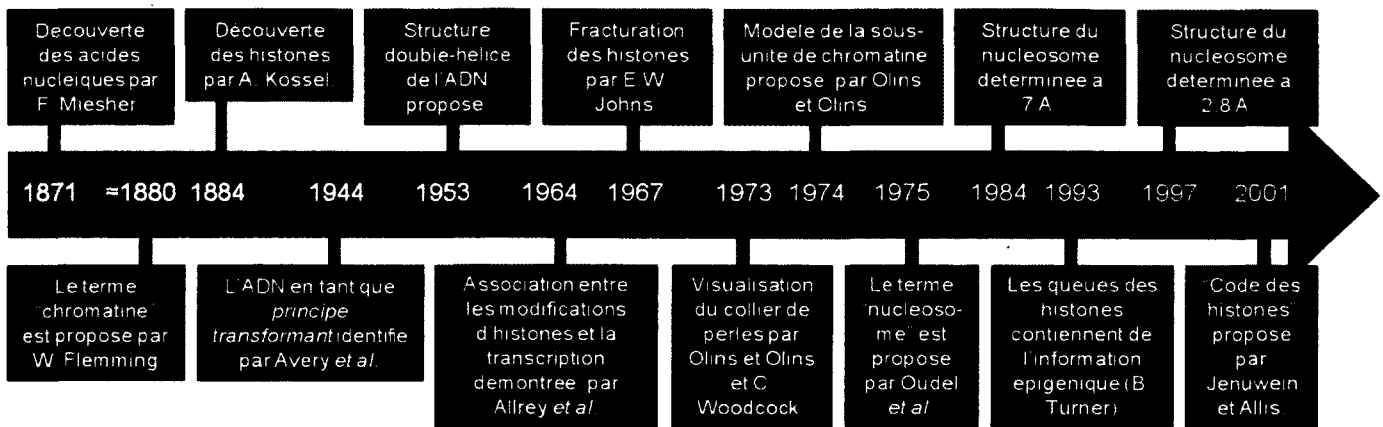


Figure 1 : Rappel historique des découvertes importantes au niveau de la chromatine. Figure adaptée de Olins et Olins (2003).

1.2.2 Structure

L'ADN est un polymère biologique composé de groupements phosphates reliant les désoxyriboses sur lesquels une base azotée est rattachée (figure 2) afin de former une longue chaîne. Cette chaîne possède deux extrémités, les extrémités 5' et 3', qui seront inversées dans le brin complémentaire. Chaque chaîne ininterrompue forme un chromosome doté de 2 extrémités : les télomères.

Il existe deux types de bases azotées : les pyrimidines, soit la thymine (T) et la cytosine, (C) et les purines, soit l'adénine (A) et la guanine (G). La double-hélice de l'ADN est due, en partie, aux ponts hydrogènes qui se formeront uniquement entre une pyrimidine et une purine complémentaire. Trois ponts hydrogènes se formeront entre la cytosine et la guanine et seulement 2 entre la thymine et l'adénine.

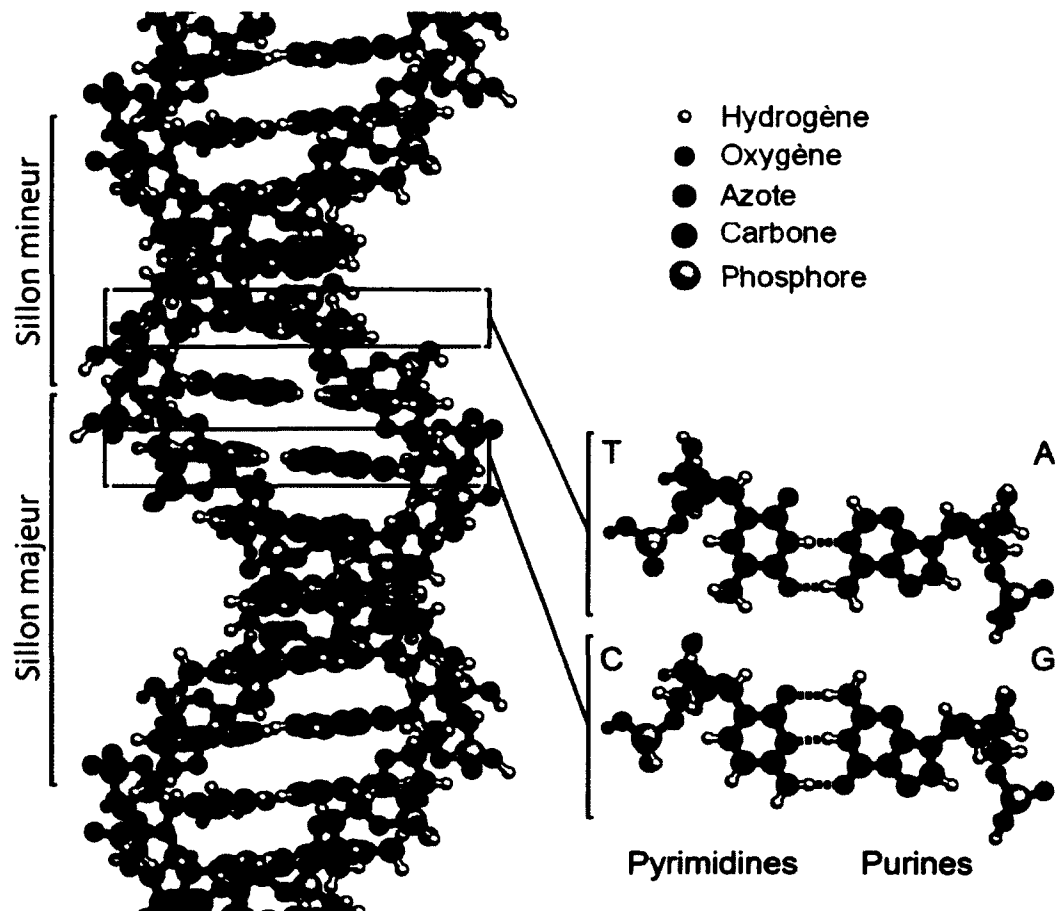


Figure 2 : Structure de l'ADN. Le squelette de la double-hélice de l'ADN est composé d'une chaîne de désoxyriboses reliés entre eux par des liens phosphodiester. Les bases azotées sont reliées aux désoxyriboses et font face à leur base azotée complémentaire sur le brin de face afin de former les liens hydrogène permettant de stabiliser la structure de l'ADN. Image traduite et utilisée avec la permission de Richard Wheeler (RichardWheeler.net).

1.3. La chromatine chez *Saccharomyces cerevisiae*

Initialement proposé par Flemming, le terme chromatine est toujours utilisé pour définir l'ADN et les protéines y étant associées dans le noyau cellulaire. En fait, l'une des premières utilités des protéines associées à l'ADN est de permettre la compaction de cette dernière. Dans les cellules eucaryotes, les longues chaînes ADN doivent être contenues dans une structure ayant une taille bien définie : le noyau cellulaire. Par exemple, chez les cellules humaines, 2 m d'ADN doivent être contenus dans un noyau allant d'une taille de 5

à 20 µm de diamètre selon le type cellulaire (Jansen et Verstrepen, 2011). La cellule doit donc faire face à certains problèmes :

- Les brins d'ADN sont chargés négativement (ils se repoussent donc) et d'une très grande longueur par rapport au noyau.
- Le repliement de l'ADN doit permettre aux processus biologiques, tel que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN, de procéder normalement.

1.3.1 Le nucléosome, l'unité de base

La première étape de condensation de l'ADN est obtenue par un enroulement vers la gauche de 147 paires de bases (pb) autour d'un octamère d'histone (Richmond *et al*, 1997). Cette structure nucléo-protéique est nommée le nucléosome (figure 3). L'ADN s'enroule 1,65 fois autour des histones H2A, H2B, H3 et H4. Ces histones sont présentes en 2 copies dans le nucléosome et se retrouvent sous forme des dimères (H2A-H2B)₂ et (H3-H4)₂. Étant des protéines chargées positivement, elles favorisent l'enroulement de l'ADN autour de leur structure cylindrique. Les histones sont des protéines très fortement conservées entre les espèces eucaryotes. Toutefois, les histones de la levure sont parmi les plus divergentes par rapport aux histones des mammifères (Baxevanis et Landsman, 1998).

Les nucléosomes sont séparés les uns des autres par une séquence d'ADN libre, nommée ADN de liaison, qui possède une longueur variable selon les organismes analysés. Par exemple, chez les métazoaires, un ADN de liaison d'une longueur moyenne de 190 pb est présent (White *et al*, 2001). De façon contrastante, chez la levure *S. cerevisiae*, les nucléosomes sont très rapprochés les uns des autres, de l'ordre d'un nucléosome à chaque 162 ± 6 pb (Horz et Zachaud, 1980). Conséquemment, l'ADN de liaison chez la levure est court, allant de 15 à 20 pb, ce qui pourrait expliquer l'absence d'histone de liaison par rapport aux eucaryotes supérieurs (Jansen & Verstrepen, 2011).

Finalement, chaque histone possède une « queue » protéique N-terminale flexible saillant du cœur du nucléosome. Ces queues seront modifiées de façon covalente par diverses enzymes suite à la traduction des histones. Les modifications post-traductionnelles des histones sont multiples et variées, telles que la sumoylation (Shiio & Eisenman, 2003), l'ubiquitination (Goldknopf *et al*, 1975), la phosphorylation (Taylor, 1982), l'acétylation ou la méthylation (Allfrey *et al*, 1964; Rea *et al*, 2000), et auront un impact majeur au niveau de la structure de la chromatine et de la transcription (figure 4). Ces modifications et leurs impacts forment ce qui est communément appelé le « code des histones » (Jenuwein et Allis, 2001).

Par exemple, de hauts niveaux d'acétylation sont associés à une structure dite « ouverte » de la chromatine, permissive à la transcription (Allfrey *et al*, 1964; Berger, 2002; Richards & Elgin, 2002). En effet, il a été démontré, tant *in vitro* qu'*in vivo*, que l'acétylation des lysines des queues des histones permettait leur dissociation de l'ADN plus facilement (Chandy *et al*, 2006; Reinke & Hörz, 2003). De plus, l'acétylation des histones semble aussi nécessaire afin de permettre à certains processus de réparation de l'ADN d'avoir accès aux dommages, ce qui sera décrit dans la section 1.5.3.3 (Yu *et al*, 2011). D'ailleurs, la dissociation plus aisée de l'ADN des histones acétylés sera l'un des thèmes abordés au niveau du chapitre 3 de cette thèse.

L'acétylation des histones est modulée par des enzymes ayant une activité spécifique pour des positions et des histones données : Par exemple, l'histone acétyl-transférase (HAT) Gcn5p catalyse l'acétylation de l'histone H3 aux lysines 9 et 14 et des lysines 9, 14, 23 et 27 de l'histone H2B et l'histone déacétylase (HDAC) Sir2p catalyse la déacétylation des histone H3 et H4 (Georgakopoulos & Thireos, 1992; Grant *et al*, 1997; Blander & Guarente, 2004).

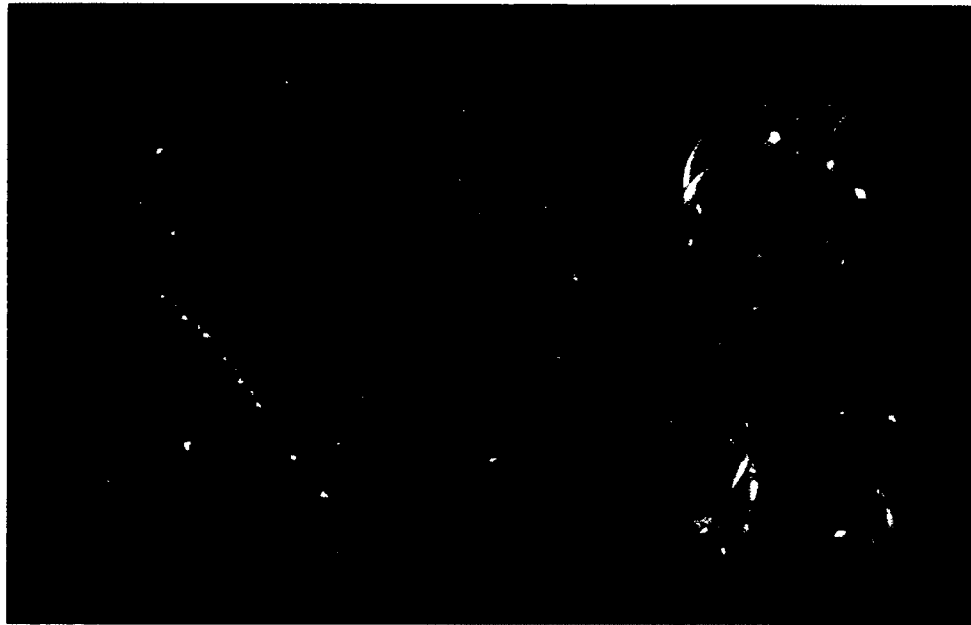


Figure 3 : Structure du nucléosome. Structure du nucléosome à une résolution de 2,8 Å où 147 bp des 2 brins d'ADN (ruban vert et brun), s'enroulent autour du nucléosome. Ce dernier est composé de huit histones, chacune présente en 2 copies : un dimère de H2A (jaune) et H2B (rouge) et le second composé de H3 (bleu) et H4 (vert). Image tirée de (Richmond *et al*, 1997).

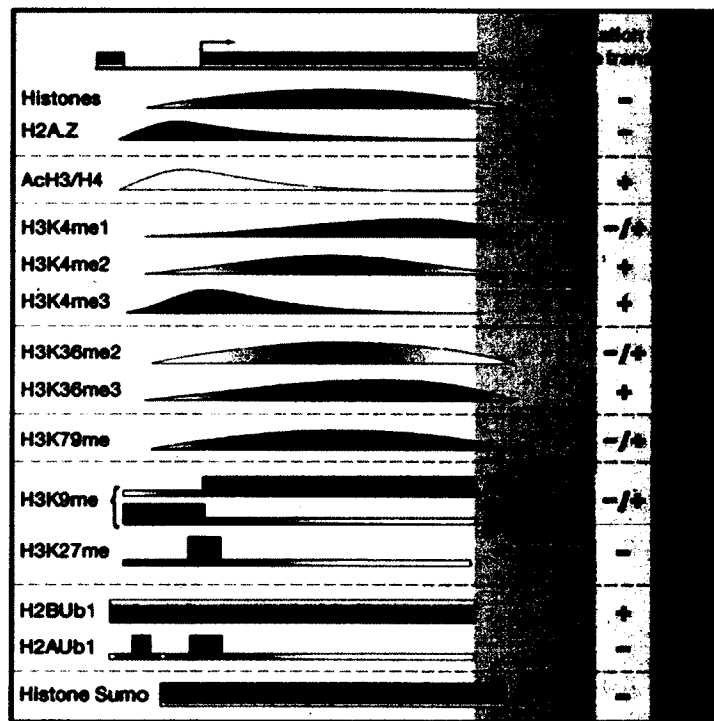


Figure 4 : Patron de modification des histones selon l'état transcriptionnel des gènes. Le patron de modification des histones est présenté sur un gène arbitraire en relation à son promoteur, l'ORF et la région intergénique en 3' (références originales présentes dans (Shilatifard, 2006; Workman, 2006)). Les lignes représentent des patrons déterminés par approches génomiques et les rectangles des données obtenues par des analyses spécifiques. À l'exception des données sur la méthylation K9 et K27, les données proviennent d'analyses effectuées chez la levure (Image traduite et adaptée de Li *et al*, 2007).

1.3.2 La structure de la chromatine

La répétition successive de nucléosomes sur l'ADN forme une fibre de 11 nm telle qu'observée par microscopie électronique lors des travaux de Olins et Olins en 1973 (Olins & Olins, 2003), qu'ils dénommèrent le « collier de perles » (figure 5). Suite à cette première compaction de l'ADN, les nucléosomes s'enroulent dans une fibre de 30 nm. Globalement, il existe deux classifications de chromatines : l'euchromatine, transcriptionnellement active, et l'hétérochromatine, définie initialement comme une région fortement condensée à travers le cycle cellulaire et inactive au niveau de l'expression de gènes (Rusche *et al*, 2003; Hennig, 1999).

L'absence de niveau de compaction additionnelle et les différences structurales de la chromatine de *S. cerevisiae* par rapport aux eucaryotes supérieurs pourrait s'expliquer par l'absence d'histone H1 ainsi que des légères différences au niveau des acides aminés présents dans les histones de cette levure (White *et al*, 2001; Jansen et Verstrepen, 2011).

Par contre, il existe des régions dans la chromatine de *S. cerevisiae* qui présentent une structure de la chromatine ayant des similitudes avec l'hétérochromatine retrouvée chez les eucaryotes supérieurs (Grunstein *et al*, 1995; Hennig, 1999; Sun *et al*, 2011). Ces régions possèdent une forme de chromatine spécialisée permettant d'inhiber l'expression des gènes présents dans ces domaines. Cette forme de chromatine répressive fut initialement identifiée au niveau des gènes du locus du type sexuel et, par la suite, aux télomères ainsi qu'au locus de l'ADN ribosomal. Les protéines impliquées dans ce processus sont nommées les « *Silent Information Regulators* », ou *sir* (Rusche *et al*, 2003; Biswas *et al*, 2009; Braunstein *et al*, 1993). Leur rôle spécifique, tout particulièrement celui de Sir2p, au niveau du locus de l'ADN ribosomal sera discuté plus loin (voir section 1.3.5).

En conclusion, la structure de la chromatine se doit d'être dynamique et offre un mode de contrôle important au niveau de l'expression des gènes, la réplication de l'ADN, la recombinaison et la réparation de l'ADN.

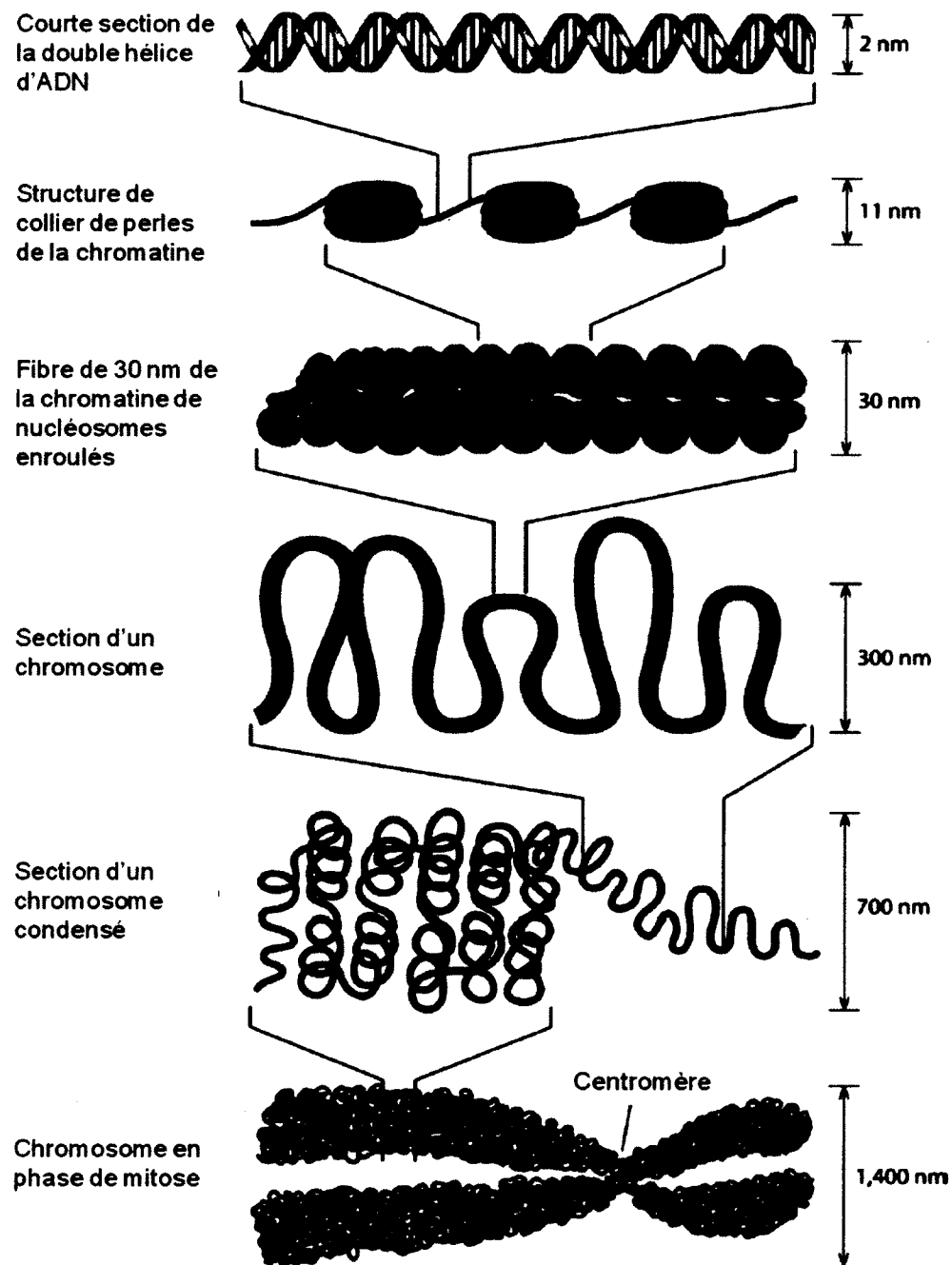


Figure 5 : Hiérarchie de la chromatine. L'ADN double-brin s'enroule autour du nucléosome, unité de base de la chromatine, sur 147 pb. Cette structure, fréquemment nommée collier de perles, est issue du fait que les nucléosomes sont espacés par une section d'ADN de liaison de 18 pb en moyenne chez *S. cerevisiae*. Ensuite, ces derniers s'enroulent afin de former la fibre de 30 nm qui, suite à une compaction subséquente, formeront les chromosomes mitotiques. Figure adaptée de Jansen et Verstrepen, 2011.

1.3.3 La chromatine de l'ADN ribosomal

Dans une structure particulière du noyau, le nucléole, siège la transcription des ARN ribosomaux (ARNr) (Taddei *et al*, 2010). Ces derniers sont critiques à la production de ribosomes fonctionnels. Le nucléole possède une forme caractéristique, celle d'un croissant accolé à la membrane nucléaire, et occupe environ le tiers du volume total du noyau (Molenaar *et al*, 1970; Yang *et al*, 1989).

En plus de sa fonction de compartimentation des protéines nécessaires à la transcription et la maturation des ARNr, le nucléole permet aussi la séquestration de molécules possédant une activité seulement à l'extérieur du nucléole. À titre d'exemple, lors de dommages à l'ADN chez l'humain, il y aura séquestration de Mdm2, impliquée dans la dégradation de p53, dans le nucléole. Subséquemment, l'augmentation de la stabilité et de l'activité de p53 causera une induction de l'apoptose chez ces cellules (Bernardi *et al*, 2004). La régulation de la télomérase est aussi régulée par un mécanisme similaire, où la sous-unité catalytique Est2p est séquestrée au nucléole afin de réduire l'activité de la télomérase (Lin & Blackburn, 2004).

La structure du nucléole en tant que telle dépend de la forte transcription par la polymérase à ARN I (pARN-I) des gènes de l'ARN ribosomal. Par exemple, chez des souches où une sous-unité de la pARN-I est sensible à la température (« *ts* »), une perte de la structure nucléolaire est observée à température restrictive (Oakes *et al*, 1993). Étant donné que les cellules doivent synthétiser un grand nombre de ribosomes, de l'ordre d'environ 2000 par minute, le nucléole est le siège de 60% de la transcription totale dans une cellule en croissance exponentielle (Reeder & Roeder, 1972; Warner, 1999). D'ailleurs, la transcription des ARNr corréle avec une croissance cellulaire rapide. Par exemple, l'augmentation de la taille et du nombre de nucléoles sont reconnus depuis plus de 150 ans comme un signe de l'état prolifératif non-contrôlé des cellules cancéreuses lors de diagnostics de cancers (figure 6) (Beale, 1860). Au niveau du développement de nouvelles molécules à action anti-cancéreuse, le nucléole, et tout ce qu'il contient, est présentement une cible de choix (Drygin *et al*, 2010).

L'importance de la transcription de pARN-I est sans équivoque, puisqu'en son absence, la ribogénèse ne peut s'effectuer. De plus, la transcription du locus de l'ADNr lui-même est indispensable pour la formation de la structure nucléolaire (Scheer *et al*, 1984; Albert *et al*, 2011).

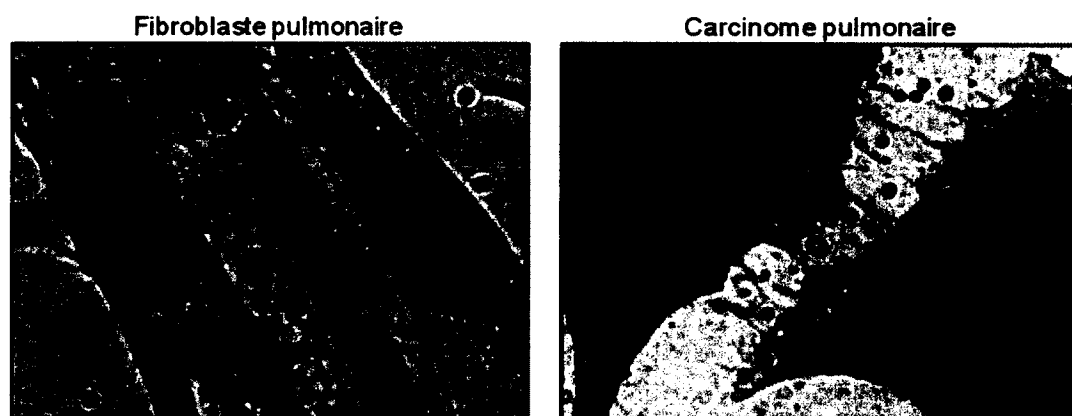


Figure 6 : Nucléoles de cellules cancéreuses. Les nucléoles (flèches) de cellules saines (gauche), comparés à des cellules cancéreuses (droite) suite à une coloration à l'argent. Image adaptée de (Drygin *et al*, 2010).

Chez la levure, le locus de l'ADN ribosomal (ADNr), présent à l'intérieur du nucléole, est situé sur le chromosome XII (Petes, 1979; Petes & Botstein, 1977). Au-delà de son positionnement particulier à l'intérieur du noyau, ce locus présente aussi une structure de chromatine spécifique. Ce dernier est en fait une structure hautement répétée : environ 150 à 200 gènes de l'ARNr y sont présents, alignés l'un derrière l'autre en tête-à-queue (Figure 7a) (Philippsen *et al*, 1978).

Chaque répétition possède une longueur de 9,1 kb et permet la transcription de l'ARNr précurseur 35S par la polymérase à ARN I. La région transcrite est d'une longueur de 6,47 kb (Philippsen *et al*, 1978). Suite à la transcription de ce précurseur, ce dernier sera ensuite clivé et modifié afin d'obtenir les ARNr matures 18S, 5.8S et 25S. À l'intérieur de cette séquence codante, se retrouvent : ETS-1 (« *External transcribed spacer* »), 18S, ITS-1 (« *Internal transcribed spacer* »), 5.8S, ITS-2, 25S et ETS-2. De plus, il est important de mentionner qu'un petit gène transcrit par la polymérase à ARN II est présent à l'intérieur et en sens inverse de la région 25S (Coelho *et al*, 2002). Ce gène, TAR1 (« *Transcript*

Antisense to ribosomal RNA »), fut récemment identifié et il ne serait transcrit que lorsqu'il est contenu à l'intérieur des cercles extra-chromosomiques contenant des répétitions d'ADNr (Bonawitz *et al*, 2008; Poole *et al*, 2012), tel que défini plus loin, dans la section 1.3.5.

Entre 2 séquences précurseur 35S, la « région intergénique », possède (présentés en figure 7b - Sogo & Thoma, 2003):

- Une barrière de la fourche de réplication (RFB)

À ce site, la protéine Fob1p sera recrutée afin de bloquer la fourche de réplication (Kobayashi & Horiuchi, 1996). La RFB bloque la progression de la fourche de réplication provenant d'une seule direction, celle opposée à la transcription du gène de l'ADNr, afin de permettre la réplication relativement unidirectionnelle du locus de l'ADNr (Linskens & Huberman, 1988; Brewer & Fangman, 1988). La RFB est aussi impliquée au niveau du maintien du nombre de copies de l'ADNr, tel que discuté en section 1.3.5.

- Une région « *enhancer* » de la transcription

La région de l'*enhancer* est située tout juste après le gène 35S et avant la RFB (Elion & Warner, 1984, 1986). Les gènes ribosomiaux actifs sont suivis, en aval, d'un élément « *enhancer* » non-nucléosomal (Dammann *et al*, 1995) qui augmentera le taux de réinitiation de la transcription au niveau des promoteurs actifs (Banditt *et al*, 1999). De plus, à l'intérieur de cette région, réside le site principal de terminaison de la transcription par la pARN-I du gène précédent (Prescott *et al*, 2004; Lang & Reeder, 1993). Malgré que des sites de terminaisons secondaires plus en aval aient été identifiées (Van der Sande *et al*, 1989), ces données restent encore à valider, puisque des études subséquentes n'ont pu confirmer la présence de ces sites secondaires (Prescott *et al*, 2004; Lang & Reeder, 1993).

- Un ARNr 5S transcrit par la polymérase à ARN III

Une fois attachée à l'ADN, la polymérase à ARN III est en mesure de répéter à plusieurs reprises la transcription du même gène, cet événement se nomme la réinitiation facilitée (Fernández-Tornero *et al*, 2010). Des analyses à haute résolution afin d'obtenir le positionnement des nucléosomes dans cette région suggèrent qu'un nucléosome peut occuper de multiples positions (Buttinelli *et al*, 1993).

- Une origine de réplication (ARS)

La réplication de l'ADNr s'effectue à partir d'environ le tiers des origines de réplifications (Skryabin *et al*, 1984). L'initiation de la réplication s'effectue en tout temps à partir d'un ARS en aval d'un gène ribosomal transcrit (Muller *et al*, 2000). La réplication à partir d'une ARS procède de façon bidirectionnelle jusqu'au contact des barrières de la fourche de réplication. Par la suite, la réplication est unidirectionnelle (Linskens & Huberman, 1988; Brewer & Fangman, 1988).

- Une région importante pour l'initiation de la transcription par la polymérase à ARN I (TIR, pour « *Transcription Initiation Region* »)

Cette région promotrice contient les séquences importantes afin que le recrutement de la polymérase à ARN I puisse s'effectuer correctement. Ces séquences, ainsi que le fonctionnement de l'initiation de la transcription, sont définis dans la section 1.4.2

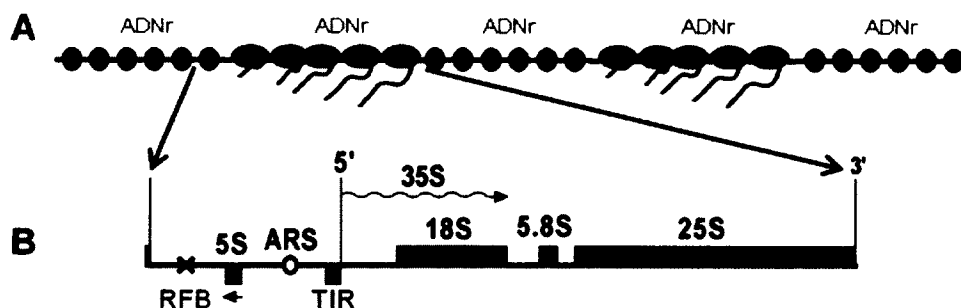


Figure 7 : Structure du locus de l'ADN ribosomal. (A) L'ADNr est présent sur le chromosome XII en une série répétée en tête-à-queue l'un à la suite de l'autre. (B) Une répétition de 9,1 kb possède un ARNr précurseur 35S (flèche vague), permettant la formation subséquente des ARNr 18S, 5,8S et 25S. Dans la région intergénique, définie comme la région entre la fin et le début d'un ARNr précurseur 35S, sont présents : un site de barrière de la fourche de réplication (croix rouge) où Fob1p se lie, le gène 5S (rectangle violet), une origine de réplication (ARS – cercle rouge) et une région importante pour l'initiation de la transcription par la polymérase à ARN I (TIR – boîte bleue, TIR est décrite plus précisément dans la section 1.4.2).

Ces répétitions ne sont pas toutes transcrites, même lors de la phase exponentielle de croissance cellulaire, environ la moitié des gènes sont transcrits, ce qui implique deux structures de chromatines dans ce locus au niveau des régions codantes de l'ARNr 35S (Dammann *et al*, 1993; Conconi *et al*, 1989).

La première structure retrouvée au niveau de l'ADNr est considérée « fermée ». Elle n'est pas en transcription par la pARN-I et contient des nucléosomes espacés de façon régulière.

Les analyses ayant permis la caractérisation de cette fraction de l'ADNr sont résumés en figure 8 et ont fait l'objet d'article de revue précédemment par notre laboratoire (Toussaint *et al*, 2005; Tremblay *et al*, 2009). Lors d'une digestion à la nucléase micrococcale (MNase), cette population d'ADNr était protégée d'une dégradation complète et présentait un patron nucléosomal, tant chez *Xenopus laevis*, chez la souris que chez la levure (Reeves, 1978a, 1978b; Davis *et al*, 1983). De plus, elle arbore un aspect de « bulles nucléosomales » lors de photopontage au triméthylpsoralène et de visualisation par microscopie électronique (Dammann *et al*, 1993). En effet, suite au photopontage (Figure 8A,B,C) le triméthylpsoralène n'aura pu s'intercaler qu'au niveau des régions de l'ADN de

liaison entre les nucléosomes. Une fois l'ADNr déposé sur une grille de microscopie électronique en conditions dénaturant l'ADN, un patron de « bulles nucléosomales » fut observée dans cette fraction « fermée » (Figure 8D – provenant des travaux de Dammann *et al*, 1993). De plus, il a été démontré que cette population n'est pas transcrite par une analyse utilisant de concert le triméthylpsoralène et la transcription *in vitro* en présence de nucléotides radiomarqués (Figure 8E - Conconi *et al*, 1989).

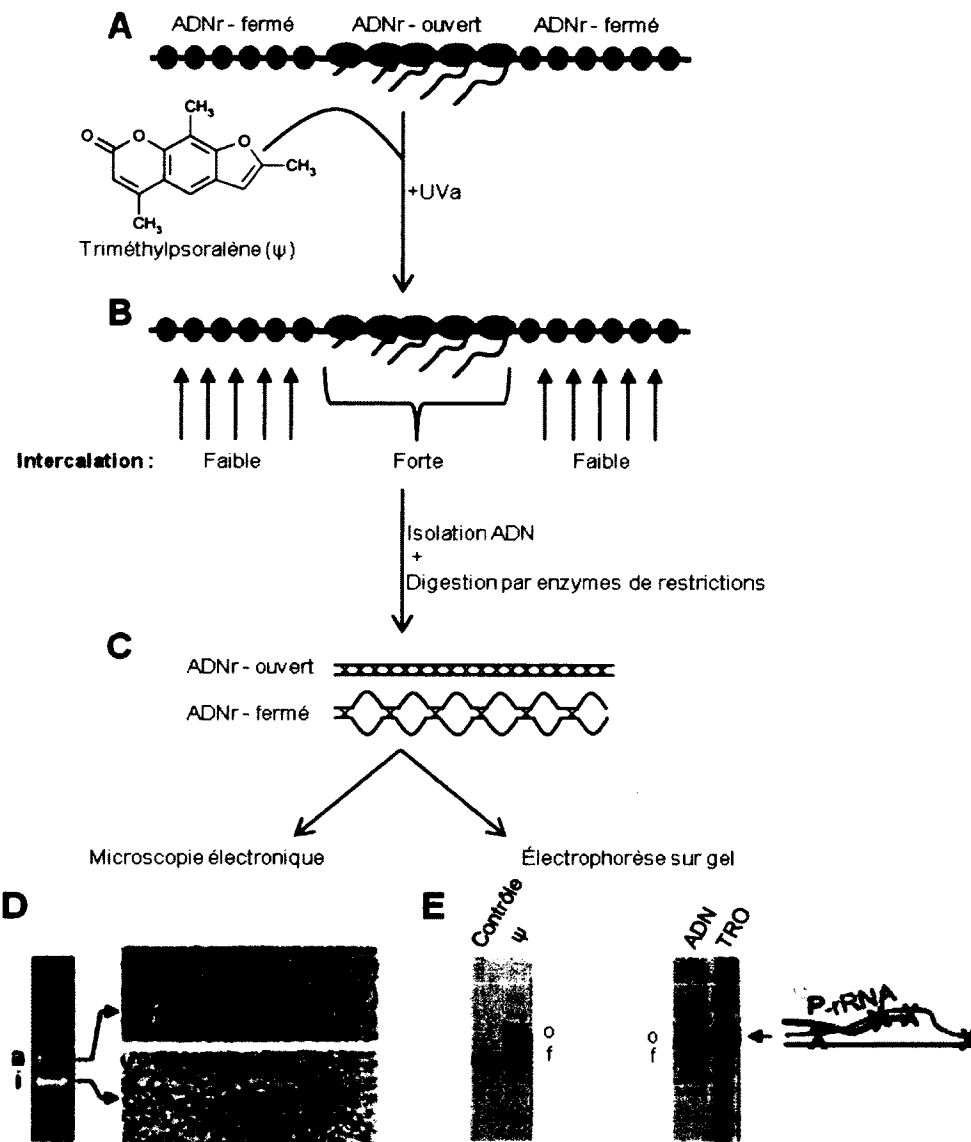


Figure 8 : Caractérisation de la chromatine des gènes de l'ARNr. (A) Des levures intactes ou des noyaux isolés furent irradiés aux Uva en présence de triméthylpsoralène (ψ). (B) L'intercalation du ψ n'est possible qu'entre les nucléosomes, dans l'ADN de liaison, au niveau de l'ADNr fermé comparativement à la possibilité d'une forte intercalation dans l'ADNr ouvert, les nucléosomes y étant absents. Le ψ reste attaché à l'ADN de façon covalente, même après l'isolement de l'ADN (C). L'ADNr purifié, puis digéré avec des enzymes de restrictions appropriées, séparé par électrophorèse sur gel et coloré au bromure d'éthidium (D). La fraction ouverte, retardée sur gel, est un ADN bicaténaire en condition dénaturante, comparativement à la fraction fermée, où des bulles simple-brin d'ADN régulièrement espacées caractérisant la chromatine nucléosomale sont visibles. Alternativement, l'ADN isolé fut séparé par électrophorèse sur gel, transféré sur membrane et hybridé avec une sonde spécifique aux gènes de l'ARNr (E). Une fois encore, le fragment le plus retardé correspond à l'ADNr ouvert par rapport au fragment de l'ADNr fermé. À droite, des cellules perméabilisées furent incubées en conditions permettant la transcription en présence de NTPs radioactifs. Le photopontage au ψ subséquent permet le pontage des ARNs aux ADNs. L'ADN isolé fut digéré par enzyme de restriction et séparé par gel d'électrophorèse. Le gel fut par la suite transféré sur membrane pour être hybridé avec une sonde spécifique aux séquences d'ADNr (ligne « ADN ») ou séché et exposé sur film (ligne « TRO »). Figure adaptée des figures de (Toussaint *et al*, 2005; Dammann *et al*, 1993).

Jusqu'à récemment, l'utilité pour une cellule de conserver une grande quantité d'ADNr fermé était débattue. Cette fraction était vue comme un bassin de gènes pouvant être disponible pour augmenter la transcription d'ARN ribosomiques. Récemment, les travaux de Ide *et al* (2010) (le résultat principal est présenté en figure 9) ont démontré l'utilité de cette fraction au niveau de la maintenance de l'intégrité du génome étant donné qu'une réduction de la taille du locus de l'ADNr, causant une réduction de la quantité de l'ADNr « fermé », augmente la sensibilité aux agents mutagènes (Ide *et al*, 2010; Aragón, 2010; Schneider, 2012). De plus, dans cette étude, il fut démontré que l'abrogation de la transcription par la pARN-I causait la perte de ce phénotype, impliquant donc le processus de forte transcription au niveau de la sensibilité aux agents mutagènes (Ide *et al*, 2010).

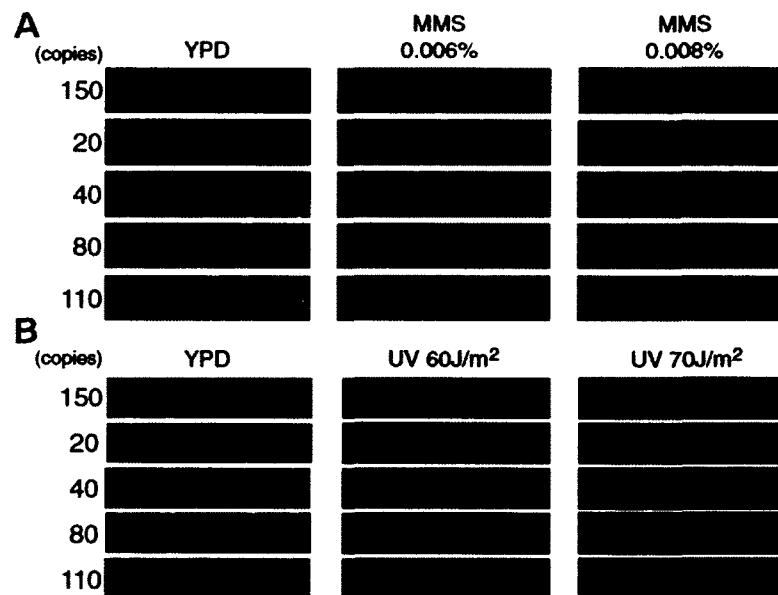


Figure 9 : Effet de la réduction de la taille du locus de l'ADNr sur la sensibilité aux agents mutagènes. (A) Test de sensibilité de *S. cerevisiae*, possédant un nombre variable de répétition de l'ADNr (copies allant de 20 à 150) à l'agent mutagène MMS ou (B) aux rayons ultra-violets (UVC). (Image tirée et adaptée de Ide *et al*, 2010)

À l'opposé de l'ADNr fermé, l'ADNr dit « ouvert » est caractérisé par une absence de nucléosomes. Depuis longtemps, les observations démontraient l'absence de nucléosomes sous leur forme canonique (Miller & Beatty, 1969; Davis *et al*, 1983; Sogo *et al*, 1984). Par

contre les données n'éliminaient pas la possibilité que l'ADNr ouvert soit recouvert d'histones tel que l'hypothétisait certains groupes de recherche (Jones *et al*, 2007; Albert *et al*, 2012). En fait, la forte transcription des gènes de l'ADNr par la polymérase à ARN I, de l'ordre d'une polymérase par 135 paires de bases (French *et al*, 2003), empêche l'enroulement de l'ADN autour d'un nucléosome, ce qui forme donc une structure « ouverte » de chromatine. Au fil du temps, cette structure fut caractérisée par diverses méthodes et observations (figure 8):

- Par microscopie électronique grâce aux étalements de Miller où la forte transcription des gènes de l'ADNr est observable (Osheim *et al*, 2008; Miller & Beatty, 1969).
- L'ADNr ouvert est fortement accessible à la nucléase micrococcalle (MNase) (Reeves, 1978a, 1978b) ainsi qu'aux enzyme de restrictions (Widmer *et al*, 1984; Conconi *et al*, 1989).
- Une forte accessibilité à l'agent intercalant triméthylpsoralène y est observée (Sogo *et al*, 1984; Conconi *et al*, 1989).
- La présence d'ARN attaché à la fraction « ouverte » de l'ADNr. Cette observation fut obtenue par une méthode de photopontage au triméthylpsoralène en conditions permettant la transcription en présence de nucléotides radiomarqués (Figure 8E, panneau de droite - Conconi *et al*, 1989; Dammann *et al*, 1993).

Plus récemment, les travaux du laboratoire du Dr. Griesenbeck ont pu affirmer, par la méthode de clivage endogène de la chromatine (« *Chromatin endogenous Cleavage* »—ChEC), que le brin d'ADNr ouvert est recouvert de la protéine Hmo1p et qu'il est largement dépourvu d'histones (Merz *et al*, 2008). Ces travaux mirent fin au débat, encore récents, sur la composition non nucléosomale de l'ADNr ouvert (Jones *et al*, 2007).

Finalement, les gènes de l'ARNr, autant ouverts que fermés, sont distribués de façon aléatoire dans le locus. En fait, les travaux effectués dans le laboratoire du Dr. Sogo ont pu démontrer qu'une fois que la machinerie de réplication de l'ADN entrait à l'intérieur d'un gène transcriptionnellement actif de l'ADNr, les deux nouvelles copies étaient régulièrement empaquetées de nucléosomes (Lucchini & Sogo, 1995). Cette observation indique clairement que la conformation de la chromatine du locus ribosomal ne peut être héritée lors du passage de la fourche de réplication et que la réouverture de gènes s'effectue suite à la réplication en causant la perturbation des nucléosomes formés (Lucchini & Sogo, 1995; Lucchini *et al*, 2001). Des travaux subséquents furent en mesure d'identifier la nécessité de la transcription par la pARN-I afin d'ouvrir des gènes de l'ARNr fermés (voir modèle en figure 10). Suite au passage de la pARN-I, un gène restera en conformation ouverte, même en absence de transcription, puisque la protéine Hmo1p est responsable du maintien de la conformation ouverte (Wittner *et al*, 2011).

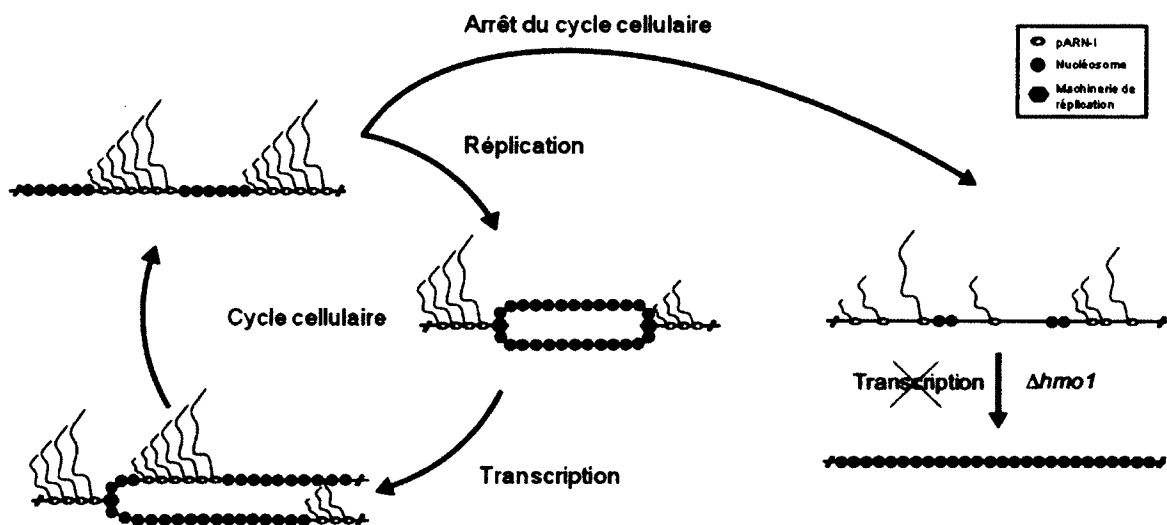


Figure 10 : Modèle expliquant la formation et le maintien de l'état de la chromatine dans le locus de l'ADNr. Chez des levures en phase de croissance, le ratio des gènes ouverts et fermés est la résultante de l'équilibre entre la déposition de nucléosomes par la réplication et le retrait des nucléosomes par la transcription de la pARN-I. L'arrêt cellulaire, causant une inhibition de la réplication cause une ouverture totale de l'ADNr. En absence de transcription, le maintien des gènes ouverts requière Hmo1p (Image tirée et adaptée de Wittner *et al*, 2011).

1.3.4 Rôle de la protéine Hmo1p sur l'ADN ribosomal

La protéine Hmo1p, d'un poids de 27 kDa, fut initialement caractérisée en 1996 (Lu *et al*, 1996). Initialement, la protéine fut isolée et le gène *HMO1* ensuite identifié grâce à la séquence protéique (Lu *et al*, 1996). Suite à des comparaisons de séquences, Hmo1p fut identifiée en tant que membre de la famille des protéines HMG1/2, de par la présence de 2 boîtes HMG (« *High Mobility Group* ») (Lu *et al*, 1996). Par contre, des travaux subséquents n'identifièrent qu'une seule boîte HMG chez Hmo1p, la deuxième étant trop divergente par rapport à la séquence consensus (Gadal *et al*, 2002).

Les protéines membres de la famille HMG1/2 sont caractérisées par un poids moléculaire d'environ 25 kDa et par la présence d'au moins une boîte HMG, tel que chez Hmo1p (Baxevanis & Landsman, 1995). À l'extrême, UBF (« *Upstream Binding Factor* »), un facteur uniquement nécessaire à la transcription des gènes de l'ADNr chez l'humain, possède six de ces boîtes (Baxevanis & Landsman, 1995; Sanij & Hannan, 2009). En comparaison avec la levure, UBF se distribue à travers l'ADNr chez l'humain et il semblerait se concentrer au niveau des gènes transcrits de l'ADNr, tout comme Hmo1p (Sanij & Hannan, 2009).

Les boîtes HMG confèrent une affinité marquée de ces protéines pour l'ADN monocaténaire comparativement à l'ADN bi-caténaire (Brown *et al*, 1993; McA'Nulty, 1996; Drygin *et al*, 2010). De plus, elles s'associent à des structures d'ADN particulières, par exemple une grande majorité des protéines HMG1/2 sera recrutée aux sites d'ADN platiné par le cisplatine (Chow *et al*, 1994).

Lors des travaux initiaux de caractérisation, le gène *HMO1* fut retiré et certains phénotypes furent observés. Premièrement, les levures présentent une croissance fortement ralentie par rapport à la normale : le temps de doublement chez des cellules *hmo1Δ* est doublé (Lu *et al*, 1996; Gadal *et al*, 2002). Deuxièmement, la chromatine des souches *hmo1Δ* est hypersensible à la MNase : lorsqu'une digestion à la MNase est effectuée chez une souche *hmo1Δ*, dans des conditions permettant l'obtention d'un patron nucléosomal

allant de 1 à 5 nucléosomes chez un type sauvage, le patron nucléosomal ne présente qu'une seule bande, correspondant à un nucléosome (Lu *et al*, 1996). Ce phénotype implique que la protéine Hmo1p ne semble pas affecter la taille ou l'espacement des nucléosomes, mais plutôt une structure de chromatine subséquente étant donné que la perte de Hmo1p augmente la sensibilité globale de la chromatine à la nucléase micrococcalle (Lu *et al*, 1996).

Un lien au niveau de l'importance de Hmo1p dans la transcription des gènes de l'ARNr fut établi par les travaux de Gadal, *et al*. en 2002. Ces derniers recherchaient des gènes surexprimés pouvant rescaper les défauts de croissances d'une souche *rpa49Δ*, protéine accessoire faisant partie de la polymérase à ARN I. Au fil de leur criblage, ils repêchèrent le gène *HMO1* comme seul candidat (Gadal *et al*, 2002). De plus, lors d'analyses de résultats de microscopie par fluorescence, ils remarquèrent la co-localisation de Hmo1p avec Fob1p, impliquée au niveau de la barrière de la fourche de réplication dans le locus de l'ADNr (Gadal *et al*, 2002). En raison de ces données, ils en vinrent à la conclusion que cette protéine était impliquée au niveau de la transcription par la polymérase à ARN I. Par la suite, l'attachement de Hmo1p à toute la séquence du gène de l'ARNr 35S fut confirmé par plusieurs groupes de recherche (Kasahara *et al*, 2007; Hall *et al*, 2006) et les travaux du groupe de Griesenbeck identifièrent avec précision que la protéine Hmo1p est une composante de la chromatine de l'ADNr ouvert lors de travaux utilisant une technique conjuguant le photo-pontage au triméthylpsoralène avec des protéines chimériques Hmo1-MNase (Merz *et al*, 2008).

Finalement, Hmo1p se retrouve aussi au niveau de promoteurs de certains gènes codant pour les protéines ribosomales (Pr), transcrites par l'ARN polymérase-II. Dans ces cas, il fut démontré que la liaison de Hmo1p à ces promoteurs créait des régions libres de nucléosomes permettant l'accès aux séquences d'ADN par d'autres facteurs de transcription (Kasahara *et al*, 2007; Hall *et al*, 2006). Par exemple, Hmo1p se retrouve au niveau du promoteur du gène de Pr RPS23A et est absent au niveau du gène RPS22B (Merz *et al*, 2008; Kasahara *et al*, 2007; Hall *et al*, 2006).

1.3.5 Les protéines SIR et leurs impacts sur l'ADN ribosomal

Les gènes SIR sont impliqués au niveau de la formation des structures hétérochromatiques présentes chez la levure *S. cerevisiae*. Ces gènes sont au nombre de quatre, soit *SIR1*, *SIR2*, *SIR3* et *SIR4* et sont tous requis pour la formation de l'hétérochromatine au niveau du locus du type sexuel (Braunstein *et al*, 1993; Blander et Guarente, 2004). Par contre, *SIR1* n'est pas requis pour la formation de l'hétérochromatine au niveau des télomères (Smith & Boeke, 1997). Conséquemment, l'un des rôles des protéines SIR est de permettre la formation d'une chromatine spécialisée permettant l'inhibition de l'expression de gènes présents dans ces domaines, par un effet nommé le « silencing ». Par exemple, l'expression de gènes insérés dans les séquences sous-télomériques est inhibée par les protéines SIR : un effet nommé TPE (« *Telomere Positioning Effect* » – Gottschling *et al*, 1990). De plus, la délétion des gènes SIR cause l'abolition du silencing au niveau du locus du type sexuel causant un phénotype nommé la pseudo-ploïdie (Rine & Herskowitz, 1987).

De la famille SIR, seul *SIR2* possède une activité au niveau du locus de l'ADNr (Smith & Boeke, 1997). À l'instar des autres membres de cette famille, la protéine Sir2p est fortement conservée: des homologues sont identifiés des bactéries aux cellules humaines (Brachmann *et al*, 1995; Hickman *et al*, 2011). Étant donné que Sir2p catalyse la déacétylation des histones H3 et H4, elle est membre de la famille des HDACs (Grant *et al*, 1997; Blander et Guarente, 2004). Par contre, Sir2p possède aussi une activité particulière d'ADP-ribosyltransférase essentielle à son fonctionnement HDAC (Tanny *et al*, 1999) afin d'effectuer la déacétylation des lysines sur les queue des histones, une molécule de NAD⁺ est convertie en 2'-O-acétyl-ADP-ribose (Tanner *et al*, 2000; Rusche *et al*, 2003).

Initialement, lors de la découverte de l'effet de *SIR2* sur la formation d'une structure répressive à la transcription par la polymérase à ARN II (« *silencing* ») dans l'ADNr, l'hypothèse fut que *SIR2* était impliquée au niveau du contrôle des 2 formes de chromatines de l'ADNr, car une souche *sir2Δ* présentait un ratio différent d'ADNr ouvert et fermé par rapport à une souche contrôle (Smith & Boeke, 1997; Straight *et al*, 1999; Rusche *et al*,

2003). En réalité, la différence au niveau du nombre de copies de gènes d'ARNr ouvert et fermé était causée par la recombinaison : la souche *sir2Δ* présentait donc un nombre total de copies d'ADNr différent de la souche contrôle, ce qui affectait le ratio ouvert/fermé (Sandmeier *et al*, 2002). Par contre, lors des travaux de Smith & Boeke, une hausse de l'accessibilité au triméthylpsoralène fut observée dans la région intergénique des gènes de l'ARNr, ce qui laisse croire que la structure de la chromatine dans cette région est plus dynamique chez une souche *sir2Δ* par rapport à une souche contrôle (Smith & Boeke, 1997) et qui sous-entend donc l'implication de Sir2p au niveau de la formation de l'hétérochromatine chez *S. cerevisiae*.

Globalement, il est possible de résumer l'effet de *SIR2* au niveau des gènes de l'ARNr en 2 aspects :

1- Inhibition de la transcription de régions transcrites par l'ARN polymérase II.

Au niveau du locus de l'ADNr, la protéine Sir2p est présente dans le complexe RENT (« **RE**gulator of **N**ucleolar silencing and **T**elophase exit »), avec Cdc14p et Net1p (Huang & Moazed, 2003; Straight *et al*, 1999). Ce complexe a la particularité de séquestrer au nucléole une protéine importante au niveau de la régulation du passage de la mitose à la phase G1, Cdc14p, qui sera relarguée à l'intérieur du noyau et du cytoplasme en fin de mitose (Shou *et al*, 1999).

Grâce à la protéine Net1p, le complexe RENT sera recruté à deux régions spécifiques au niveau de l'ADNr afin que Sir2p puisse effectuer une déacétylation locale des histones (Huang & Moazed, 2003; Goetze *et al*, 2010). Premièrement, par l'interaction entre Fob1p et Net1p, Sir2p sera recruté dans la région E-pro (figure 11) afin d'inhiber la transcription bidirectionnelle d'ARNnc (ARN non-codant) par la polymérase à ARN II dans cette région (Kobayashi & Ganley, 2005). Par contre, la taille des ARNnc observés lors de la transcription des séquences E-pro n'a pas été clairement évaluée (Kobayashi & Ganley, 2005), mais semble pouvoir traverser le gène 5S d'un côté et la RFB de l'autre (Cesarini *et al*, 2010).

De plus, le complexe RENT interagit avec la protéine Uaf30p dans la région de l'initiation de la transcription par la polymérase à ARN I (voir figure 7). Cette interaction permet de restreindre l'accès à un site cryptique d'initiation de la transcription par la polymérase à ARN II. Ce site est présent dans la région TIR de l'ADNr (Goetze *et al*, 2010).

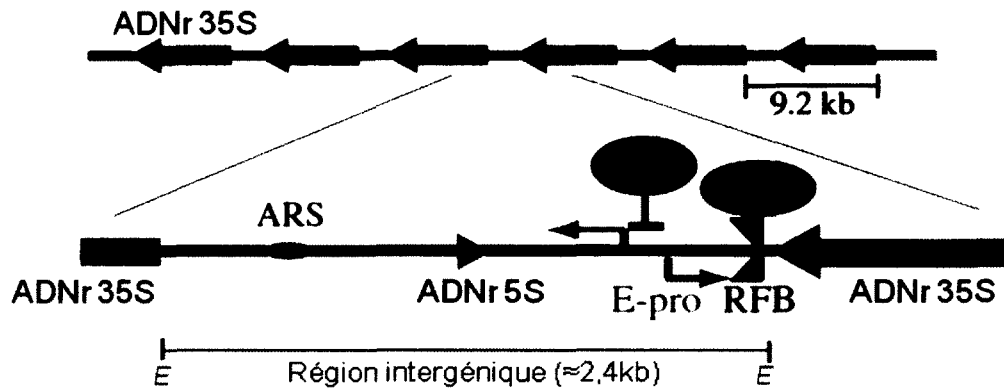


Figure 11 : Sir2p inhibe la transcription des sites E-pro. Sir2p (jaune) est recruté dans la région E-pro (rouge), présente dans la région intergénique de l'ADNr (barre grise), afin d'inhiber la transcription bidirectionnelle de ces séquences par la polymérase à ARN II (flèches rouges). La région E-pro est proche de la barrière de la fourche de réplication (triangles bleus) et Fob1p est nécessaire au recrutement de Sir2p dans la région E-pro (figure adaptée des publications (Kobayashi, 2011b, 2011a)).

Il est important de noter que le recrutement préférentiel de Sir2p aux 2 régions mentionnées précédemment n'exclut pas sa liaison au niveau de l'ADNr en entier. En effet, plusieurs travaux ont démontré que Sir2p est présent dans la totalité du locus de l'ADNr (Ha & Huh, 2011; Huang & Moazed, 2003). D'ailleurs, chez une souche *sir2Δ*, une hyperacétylation des histones H3 et H4 est observée : elle est d'environ 3 à 5 fois plus haute par rapport à une souche de type sauvage à travers le locus en entier (Huang & Moazed, 2003). À l'inverse, une surexpression de Sir2p cause une hypoacétylation des histones H3 de la région entière (Ha & Huh, 2011).

2- Régulation de la recombinaison à l'intérieur du locus de l'ADNr

Les travaux du groupe de recherche du Dr. Kobayashi ont grandement aidé à comprendre l'augmentation de la recombinaison à l'intérieur de l'ADNr chez une souche *sir2Δ* et leurs grandes lignes sont résumées dans la figure 12 (Aragón, 2010; Ide *et al*, 2010). Globalement, lorsque Sir2p n'inhibe pas la transcription des ARNnc de E-pro, les cohésines ne peuvent lier les chromatides sœurs en phase S, puisque la transcription par la polymérase à ARN II empêche la liaison des cohésines. Étant donné que l'alignement des chromatides n'est plus conservé dans ce cas, la recombinaison aura lieu de façon inégale, causant une variation de la taille du locus de l'ADNr (Kobayashi *et al*, 2004; Kobayashi & Ganley, 2005; Ide *et al*, 2010). De plus, lorsque Sir2p est absent, il en résulte une augmentation de cercles extra-chromosomiques contenant des répétitions d'ADNr (ERC) (Figure 13). Les ERCs sont des répétitions de séquences de l'ADNr, sous forme d'ADN circulaire, ayant quitté le chromosome lors d'un événement de recombinaison. L'augmentation des ERCs chez une souche *sir2Δ* s'explique par le fait que les cohésines ne sont plus en mesure de conserver les chromatides sœurs alignées (Figure 12).

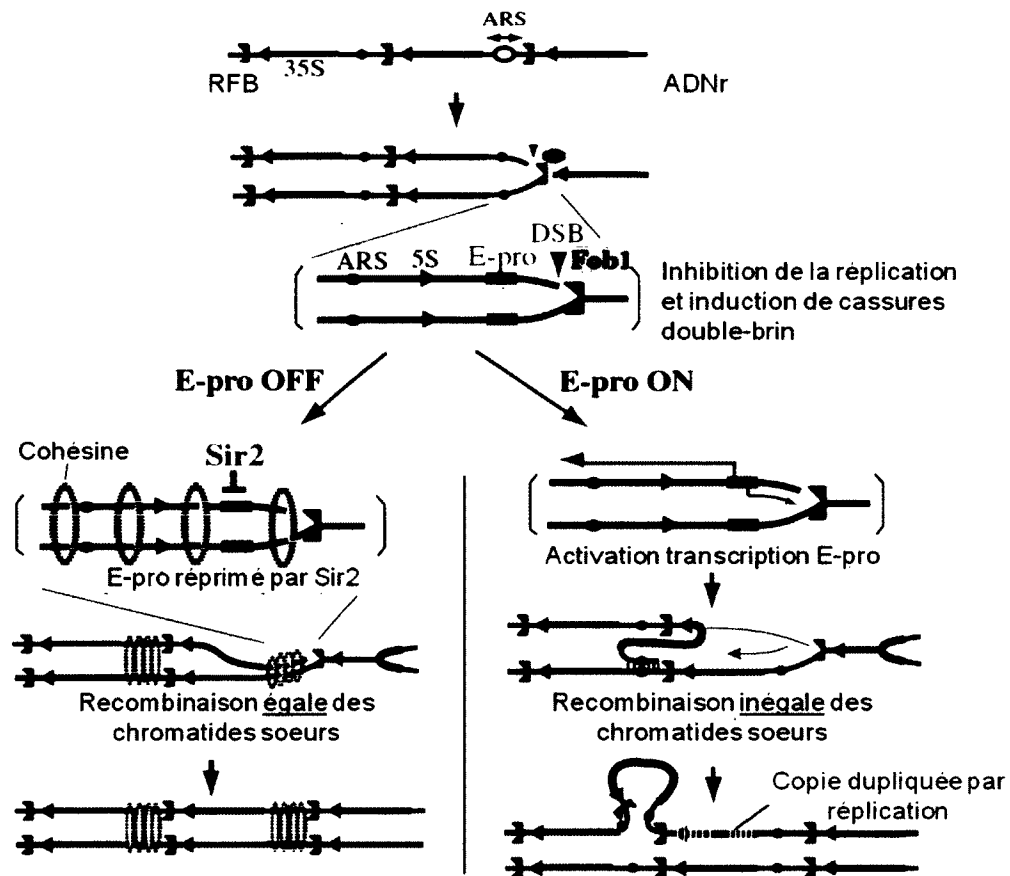


Figure 12: Recombinaison de l'ADNr. Lors de la phase S du cycle cellulaire, la fourche de réplication de l'ADN sera bloquée à la barrière de la fourche de réplication (RFB) et une cassure double-brin pourra être induite (DSB). Il y aura réparation par recombinaison homologue grâce à la chromatide soeur. Lorsque la quantité d'ADNr est normale, Sir2p réprime la transcription des E-pro, ce qui permet l'association des cohésines à l'ADNr (cercles). Dans ce cas, la recombinaison sera faite sans affecter le nombre de répétitions des gènes de l'ARNr. Lorsque le nombre d'ADNr est réduit, la transcription des E-pro n'est plus inhibée par Sir2p, ce qui empêchera la liaison des cohésines et causera une recombinaison inégale de l'ADNr causant l'expansion du locus (figure adaptée des publications (Kobayashi, 2011b, 2011a)).

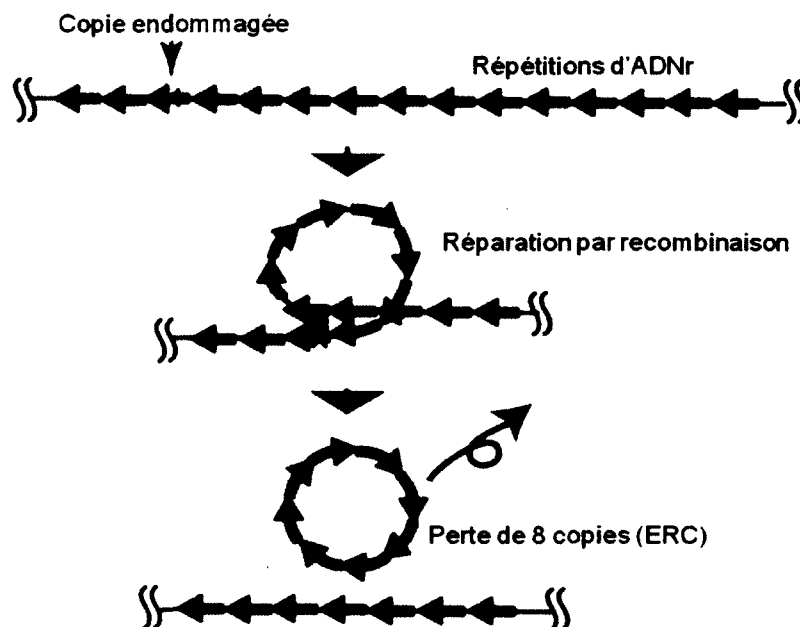


Figure 13 : Perte de copies d'ADNr lors d'un évènement de recombinaison. Lors de la phase G1 du cycle cellulaire, un dommage dans une copie de l'ADNr (flèches vertes) peut être réparé par recombinaison (boîte jaune) avec une autre répétition. Les copies situées entre celle endommagée et celle servant de matrice peuvent être perdues, formant ainsi un cercle extra-chromosomique d'ADNr (ERC). Image adaptée de (Kobayashi, 2011b, 2011a).

1.4 La transcription de l'ADN ribosomal

Chez les cellules eucaryotes, il existe trois polymérases à ARN (I, II et III) ayant chacune des rôles différents. La polymérase à ARN I (pARN-I), sujet principal de cette thèse, ne transcrit qu'une seule séquence, l'ADNr, et est responsable de la synthèse des ARN ribosomiques 18S, 5,8S et 25S. Malgré le fait que la transcription des ARN_m (messagers) est la principale fonction de la polymérase à ARN II, cette dernière est tout aussi importante pour la formation de ribosomes fonctionnels, puisqu'elle transcrit de nombreux gènes de protéines ribosomales. Finalement, la polymérase à ARN III effectue la transcription des ARN_t (transfert) ainsi que de l'ARNr 5S.

La composition protéique des trois polymérases à ARN est présentée dans le tableau 1. Elles possèdent cinq sous-unités communes (tableau 1, en noir) et la polymérase ARN I et

III en partagent deux de plus (tableau 1, gris). Historiquement, une fois identifié dans l'un des complexes, les gènes encodant pour des protéines d'une polymérase furent nommés RPA, si le gène identifié encodait une protéine de la polymérase à ARN I, RPB, s'il encodait une sous-unité de la polymérase à ARN II et RPC pour la III (Archambault & Friesen, 1993).

L'importance de la transcription de pARN-I est sans équivoque, puisqu'en son absence, la ribogénèse ne peut s'effectuer. De plus, la transcription du locus de l'ADNr lui-même est indispensable pour la formation de la structure nucléolaire (Scheer *et al*, 1984; Albert *et al*, 2011).

Tableau 1: Composition des polymérases à ARN chez *S. cerevisiae*.

Les sous-unités communes sont en fond noir ou gris (adapté de Schneider DA. 2012).

<i>Sous-unité</i>	<i>Masse (kDa)</i>	<i>Pol. à ARN I</i>	<i>Pol. à ARN II</i>	<i>Pol. à ARN III</i>
A190	186,4	RPA190	RPB1	RPC160
A135	135,7	RPA135	RPB2	RPC128
A43	36,2	RPA43	RPB7	RPC25
A14	14,6	RPA14	RPB4	RPC17
A12	13,7	RPA12	RPB9	RPC11
AC40	37,7	RPC40	RPB3	RPC40
AC19	16,1	RPC19	RPB11	RPC19
ABC 27	25,1	RPB5	RPB5	RPB5
ABC 23	17,9	RPB6	RPB6	RPB6
ABC 14,5	16,5	RPB8	RPB8	RPB8
ABC 10 α	7,7	RPB10	RPB10	RPB10
ABC 10 β	8,3	RPB12	RPB12	RPB12
A49	46,6	RPA49		RPC34
A34,5	26,9	RPA34		RPC31
				RPC37
				RPC53
				RPC82

1.4.1 La polymérase à ARN II

Tel que mentionné précédemment, la transcription par la polymérase à ARN II (pARN-II) au niveau du locus de l'ADNr est restreinte par l'effet de silencing, en partie dû à la

protéine Sir2p. Par contre, une abrogation de l'effet du silencing peut causer l'activation de la transcription des sites E-pro de l'ADNr et une délétion de *UAF30*, membre du complexe UAF, cause l'activation du site cryptique de transcription par la polymérase à ARN II situé au niveau du promoteur de l'ADNr (Li *et al*, 2006a; Siddiqi *et al*, 2001).

À l'opposé de la polymérase à ARN I, l'élongation par la pARN-II s'effectue dans un contexte où des nucléosomes sont présents. Ces derniers inhibent la transcription et se doivent d'être partiellement perturbés afin de permettre le passage des polymérases à ARN II (Jansen & Verstrepen, 2011; Izban & Luse, 1992). D'ailleurs, par des travaux *in vitro*, il fut démontré que le passage d'une pARN-II à travers un nucléosome cause la perte d'un dimère H2A/H2B et que le complexe des histones subsistants est déplacé à l'arrière de la pARN-II (Studitsky *et al*, 1994). À l'opposé, lorsque la transcription par la pARN-II est forte, il fut démontré que le nucléosome entier est retiré de l'ADN afin de permettre le passage de la polymérase (Kristjuhan & Svejstrup, 2004; Selth *et al*, 2010).

Lors de travaux subséquents, le Dr Studitsky s'est penché sur l'impact que l'intensité de la transcription par la pARN-II peut avoir sur les nucléosomes et le modèle résultant du travail de son laboratoire est résumé dans la figure 14 (Kulaeva *et al*, 2010). Globalement, lorsque la transcription par la pARN-II est relativement faible, un seul dimère H2A/H2B est retiré du nucléosome afin de permettre le passage de la pARN-II. Par la suite, le dimère ainsi perdu réintègrera l'hexamère afin de former le nucléosome complet. Si la transcription est plus forte, il se peut qu'une seconde pARN-II rencontre l'hexamère créé par la polymérase précédente. Dans ce cas, l'hexamère en entier sera expulsé de l'ADN et le nucléosome complet sera reconstitué à l'arrière (Kulaeva *et al*, 2010; Selth *et al*, 2010; Jansen & Verstrepen, 2011).

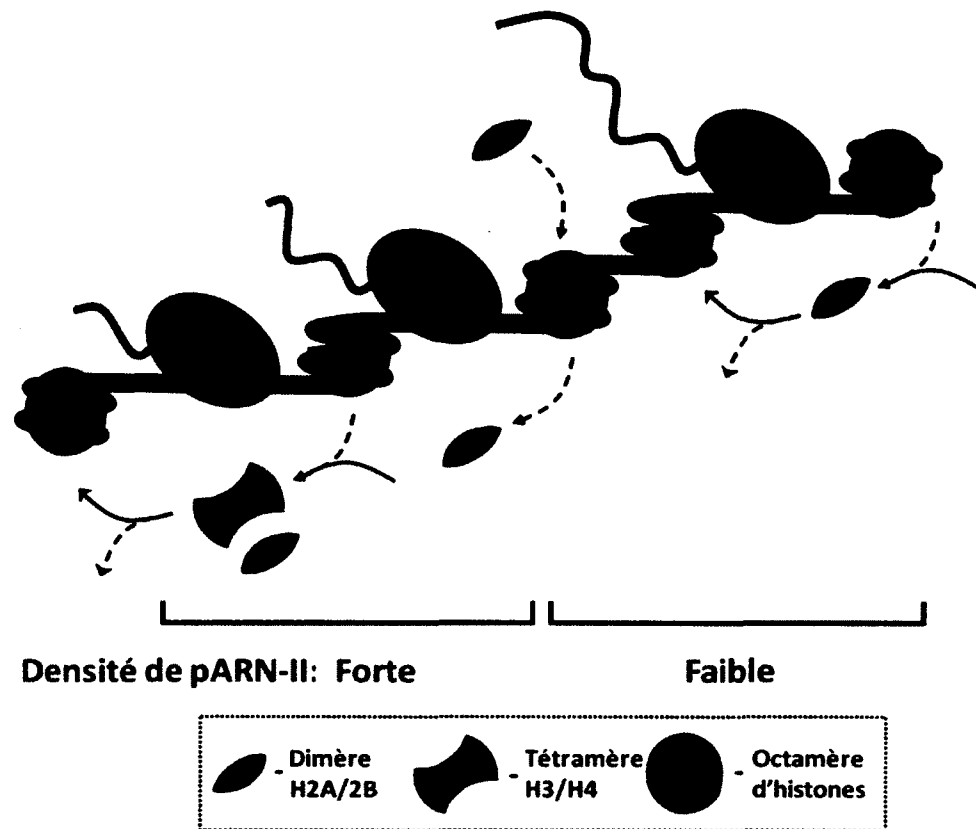


Figure 14 : Effet de la transcription par la polymérase à ARN II sur les nucléosomes. Dans le cas d'une faible transcription, un seul dimère H2A/H2B (vert) sera retiré du nucléosome afin de permettre le passage de la pARN-II (ovale bleu). Par la suite, ce dimère réintégrera l'hexamère afin de reformer un nucléosome canonique. Si une seconde polymérase advenait à rencontrer l'hexamère avant le retour du dimère perdu (tel que lorsque la transcription est forte), l'hexamère en entier sera expulsé de l'ADN et le nucléosome se reformera à l'arrière de la polymérase. Image adaptée de (Kulaeva *et al*, 2010).

1.4.2 La polymérase à ARN I

La polymérase à ARN I (figure 15) est une enzyme comportant 14 sous-unités (tableau 1). Certaines de ces sous-unités sont dites « accessoires ». Leurs gènes respectifs peuvent, dès lors, être retirés de la levure sans empêcher complètement la transcription de l'ARNr. Toutefois, la croissance cellulaire s'en retrouve fortement affectée. Ces sous-unités sont : *RPA12*, *RPA14*, *RPA34* et *RPA49* (Archambault & Friesen, 1993; Saccharomyces Genome Database). Il est important de mentionner que retirer plus d'un de ces gènes « accessoires » à la fois peut engendrer la létalité, puisque la transcription en sera trop fortement affecté

(par exemple, la délétion de RPA14 avec un autre de ces gènes « accessoire » cause une létalité) (Gadal *et al*, 1997).

Les protéines Rpa190p et Rpa135p, les plus grosses du complexe, composent le site catalytique (Mémet *et al*, 1988) et sont au cœur de la pARN-I (Kuhn *et al*, 2007). Le dimère Rpa49/34p est impliqué dans l'élongation et le recrutement de la machinerie de maturation de l'ARNr 35S (Kuhn *et al*, 2007; Albert *et al*, 2011; Beckouet *et al*, 2008). Un autre dimère, Rpa43/14p, est, quand à lui, impliqué dans l'initiation de la transcription. En fait, Rpa43p de par son interaction avec Rrn3p, un facteur de transcription, permet le recrutement de la pARN-I au promoteur, qui sera décrit dans la prochaine section (Beckouet *et al*, 2008; Peyroche *et al*, 2000). Finalement, Rpa12p est impliquée dans la terminaison de la transcription de par son activité de clivage des ARNr (Prescott *et al*, 2004).

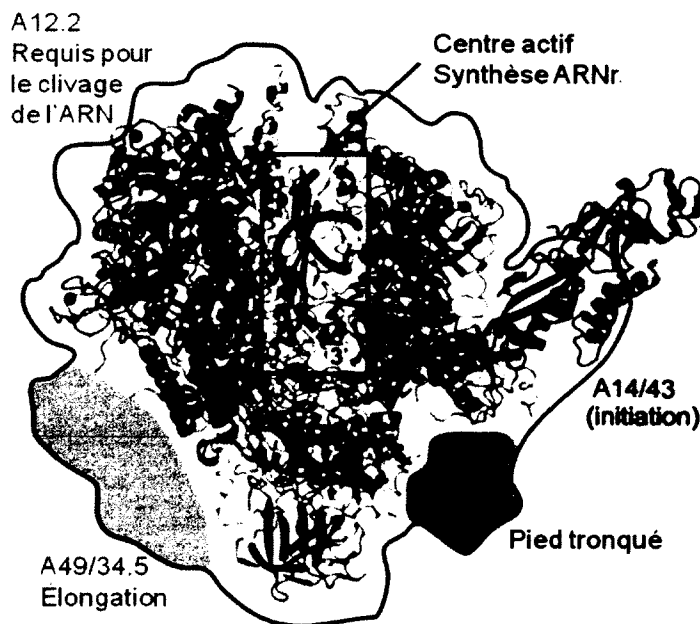


Figure 15 : Structure de la polymérase à ARN I, chez *S. cerevisiae*. La région centrale de la pARN-I est présentée (ruban gris) et les sous-unités accessoires sont présentées (orange – RPA12, vert – RPA49/34, Rouge et violet – RPA14/43 respectivement) avec leur rôle associé (image adaptée de Kuhn *et al*, 2007).

La polymérase à ARN I a été fortement conservée lors de l'évolution des espèces eucaryotes supérieures. Par exemple, les orthologues du dimère Rpa49p/Rpa34p chez l'humain sont hPAF53 et CAST (ce dernier est aussi parfois nommé ASE-1 ou hPAF49) respectivement (Albert *et al*, 2011) et plusieurs protéines partagées par toutes les polymérases à ARN sont interchangeables, *in vivo*, avec leurs homologues humains respectifs (Reich *et al*, 2009; Shpakovski *et al*, 1995).

La quantité de pARN-I présente à l'intérieur d'une cellule de levure fut évaluée à environ 15 000. De ce nombre, près du tiers est engagé en transcription (31%), moins de 3% sont capables d'initier la transcription et le reste sont des pARN-I en excès (Bier *et al*, 2004; Peyroche *et al*, 2000). En considérant qu'environ la moitié des gènes de l'ARNr (dans une souche de 150 gènes), sont en transcription lors de la phase exponentielle et qu'il y a une densité d'une polymérase pour 100 pb, il y a donc environ 5 000 pARN-I engagées dans le processus de transcription (Bier *et al*, 2004).

1.4.3 L'initiation de la transcription par la polymérase à ARN I

Les étapes relatives à l'initiation de la transcription par la polymérase à ARN I sont présentées à la figure 16. Dans un premier temps, afin que la pARN-I puisse être recrutée au niveau du complexe de pré-initiation, elle doit se lier à la protéine Rrn3p. Avant sa liaison à la pARN-I, Rrn3p est probablement présente sous forme de dimère et l'une des deux protéines du dimère se liera à la sous-unité Rpa43p de la pARN-I (Peyroche *et al*, 2000; Yamamoto *et al*, 1996; Blattner *et al*, 2011). Des travaux récents démontrent que la phosphorylation du dimère Rrn3p inhibe sa liaison à Rpa43p, ce qui confère un niveau de régulation du recrutement de la pARN-I au site de pré-initiation (Blattner *et al*, 2011) (Figure 16a). Étant donné que Rrn3p peut être remplacée par la protéine TIF-IA, présente chez les mammifères, cela indique clairement que le fonctionnement du recrutement de la polymérase à son site de pré-initiation est conservé entre ces espèces (Russell & Zomerdijs, 2005; Werner *et al*, 2009).

Il existe, chez la levure, quatre facteurs d'initiation de la transcription pour la polymérase à ARN I formant ainsi le complexe de pré-initiation : Rrn3p, TBP (« *TATA Binding Protein* ») et les deux complexes protéiques CF (« *Core Factor* ») et UAF (« *Upstream Activating Factor* ») (Schneider, 2012) (Figure 16b). L'UAF, composé de 6 sous-unités, s'attache à l'ADN, au niveau du promoteur, grâce à l'action des sous-unités Uaf30p et des histones H3 et H4. En fait, Uaf30p reconnaît une séquence spécifique et permettra l'alignement de la pARN-I au niveau du site d'initiation de la transcription (Hontz *et al*, 2009; Schneider, 2012). Par la suite, Rrn9p interagira avec TBP afin de permettre le recrutement du CF. Ce dernier complexe, composé des 3 protéines Rrn6/7/11 (Lin *et al*, 1996; Lalo *et al*, 1996; Aprikian *et al*, 2000), une fois recruté au niveau du promoteur favorisera le recrutement de la pARN-I, car le recrutement proprement-dit de la polymérase au site de pré-initiation est dû à l'interaction de Rrn3p avec le domaine C-terminal de la sous-unité Rrn6p du « core factor » (Peyroche *et al*, 2000) (Figure 16b).

Finalement, lorsque la pARN-I s'échappe du promoteur et devient compétente à l'élongation, le dimère Spt4/5p phosphorylé, qui est un facteur d'élongation (Schneider *et al*, 2006), sera recruté à la pARN-I. Ce recrutement s'effectuera grâce à l'interaction directe entre le complexe Spt4/5p, Rrn3p et d'un brin d'ARNr d'une longueur minimale de 18 nucléotides (Viktorovskaya *et al*, 2011), ce qui induira le relarguage de Rrn3p de la pARN-I (Bier *et al*, 2004). De plus, à l'opposé d'UAF, les facteurs TBP et CF seront relâchés de l'ADN lors de l'initiation de la transcription (Bier *et al*, 2004) (Figure 16c).

Suite à la transcription complète du gène de l'ARNr, la pARN-I sera disponible pour effectuer une nouvelle ronde de transcription sachant que le complexe de la pARN-I est relativement stable et qu'il n'y a pas d'échange de sous-unités de cette polymérase à travers de multiples séquences de transcription (Schneider & Nomura, 2004).

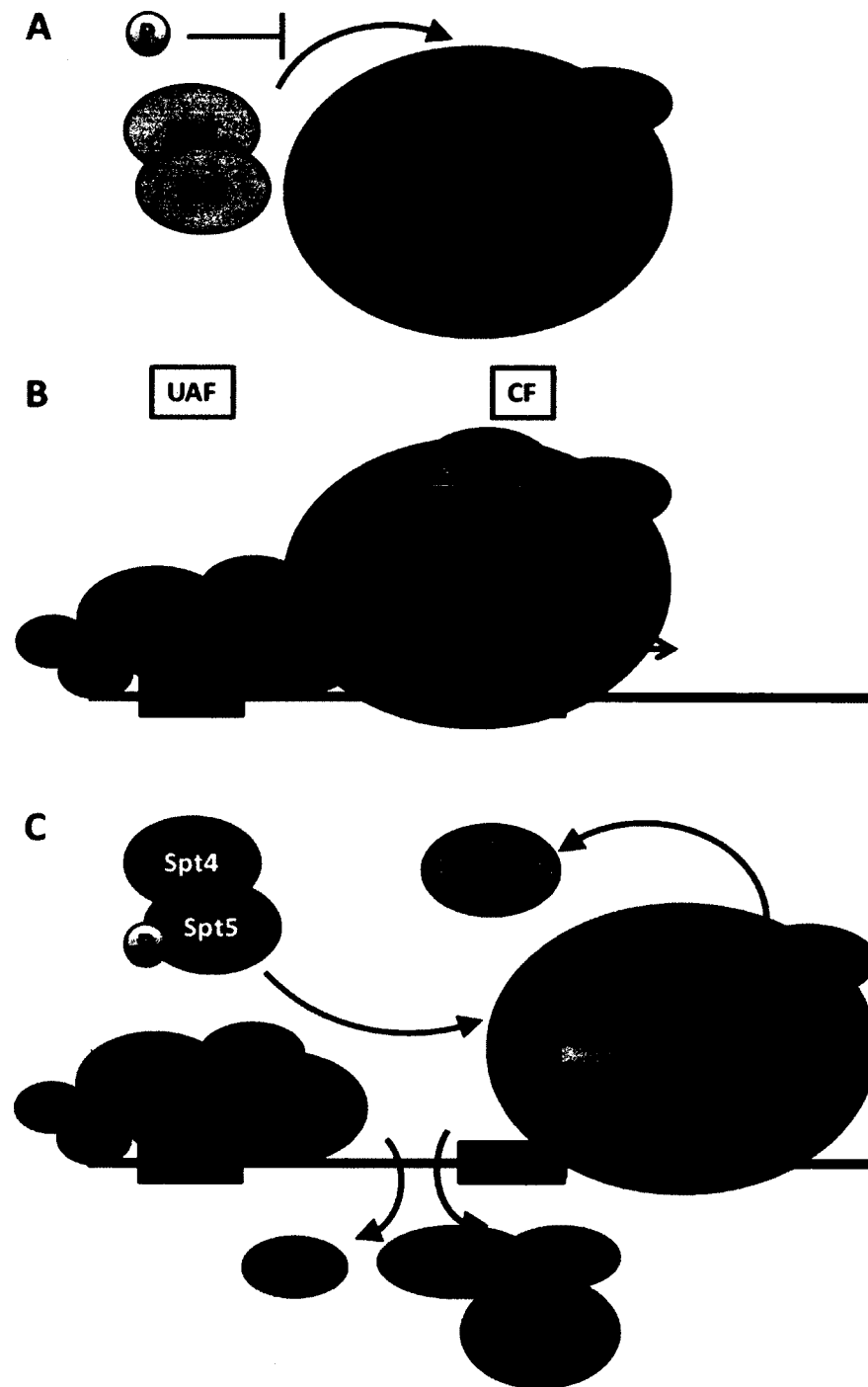


Figure 16 : Initiation de la transcription par la polymérase à ARN I chez *S. cerevisiae*. (A) Une molécule du dimère Rn3p s'attache à la pARN-I (orangée) en interagissant avec l'unité Rpa43p. La phosphorylation du dimère Rn3p inhibe cette liaison. (B) Afin que la pARN-I puisse être recrutée au promoteur, les facteurs d'initiation de la transcription UAF (vert), TBP (bleu) et CF (violet) doivent être présents. La flèche indique le site d'initiation de la transcription et les boîtes vertes correspondent aux séquences d'ADN liées par le CF (Core) et par l'UAF (UE – « *Upstream Element* ») qui sont situées dans une région de 200 pb en amont du site d'initiation. Grâce à l'interaction de Rn3p et Rn6p, membre du complexe CF, l'ARNpI sera recrutée au promoteur. (C) Suite au départ de la pARN-I du site d'initiation, Rn3p sera remplacé par le complexe d'élongation Spt4/5 phosphorylé et TBP et CF seront relâchés de leurs sites de liaison à l'ADN.

1.4.4 Régulation de la transcription de l'ADN ribosomal

Considérant que plus de 60% de la transcription totale d'une cellule de levure correspond à la transcription par la pARN-I, un système de contrôle efficace de la régulation s'avère nécessaire (Warner, 1999). Ce contrôle peut se baser sur trois éléments particuliers, soit : le nombre de copies d'ADNr ouvertes, la quantité d'initiation de la transcription et, finalement, par la vitesse de la transcription en tant que telle de la pARN-I.

Afin d'expliquer la présence combinée d'ADNr ouvert et fermé chez les eucaryotes supérieurs, l'hypothèse fut émise que l'un des rôles de ces deux populations était celle d'une régulation binaire de la transcription par l'ouverture ou la fermeture de gènes supplémentaires. Par contre, un ensemble de résultats, obtenus avec plusieurs types cellulaires de vertébrés, démontraient que l'augmentation de synthèse d'ARNr, associée à une stimulation de la prolifération des cellules, n'était pas accompagnée de modifications au niveau de la quantité d'ADNr ouvert (Wiesendanger *et al*, 1994; Conconi *et al*, 1989). Chez la levure, lors de travaux avec des souches possédant 40 ou 140 gènes d'ARNr, un nombre total équivalent de pARN-I engagées en transcription fut observé par microscopie électronique, impliquant ainsi une plus grande fréquence d'initiation dans la souche ne comportant que 40 gènes (French *et al*, 2003). De plus, les travaux du Dr. Conconi ont démontré que, même en phase stationnaire, où une baisse de 90% de la transcription par la pARN-I est observable, le ratio entre l'ADNr ouvert et fermé ne change que d'environ 10% (Fahy *et al*, 2005). En somme, la régulation de la transcription par la variation du nombre de copies ouvertes d'ADNr chez la levure n'est, au plus, que mineure. En fait, le rôle de l'ADNr fermé chez *S. cerevisiae* semble se retrouver au niveau de la stabilisation du génome, tel que présenté précédemment dans la section 1.3.3 de cette thèse (Ide *et al*, 2010; Kobayashi, 2011b; Aragón, 2010).

La régulation de la quantité d'initiation au niveau du locus de l'ADNr peut s'effectuer à de nombreux niveaux (Schneider, 2012). Par exemple, une phosphorylation de Rrn3p, lors de conditions de stress, inhibe sa liaison à la pARN-I et donc son recrutement dans le complexe de pré-initiation, réduisant ainsi la production de ribosomes et donc la croissance

cellulaire (Blattner *et al*, 2011). De plus, l'aspect dynamique du complexe de pré-initiation peut être utilisé afin de permettre un contrôle au niveau de la quantité d'initiation de la transcription (Aprikian *et al*, 2001). Par exemple, le produit du gène MOT1 semble être impliqué au niveau du contrôle de l'initiation de la pARN-I par un mécanisme encore peu défini (Dasgupta *et al*, 2007) et la protéine TBP (« *TATA binding protein* ») stimule le recrutement du CF et stabilise ce dernier au niveau du promoteur (Aprikian *et al*, 2000).

La modulation de la vitesse d'élongation afin de contrôler la quantité d'ARNr produit a aussi été observée. Par exemple, des modifications post-transcriptionnelles du complexe Spt4/5p affectent l'élongation de la pARN-I (Anderson *et al*, 2011; Leporé & Lafontaine, 2011). De plus, le complexe « polymerase associated factor 1 » (Paf1C) est reconnu comme influençant la vitesse d'élongation de la pARN-I chez la levure (Zhang *et al*, 2009, 2010).

1.5 Le maintien du génome

Toutes les molécules présentes à l'intérieur d'une cellule peuvent être endommagées. Par exemple, des radicaux libres, issus d'une réaction enzymatique, peuvent attaquer une protéine et la rendre non-fonctionnelle, forçant donc son remplacement. De toutes les molécules à l'intérieur de la cellule, l'ADN est la seule qui ne peut être remplacée étant donné qu'elle n'est présente que sous une seule copie (le complexe bi-caténaire est considéré en tant qu'une seule copie dans ce texte). Il est donc capital de conserver l'intégrité de cette molécule afin de préserver le bon fonctionnement de la cellule. Conséquemment, il existe de multiples mécanismes protégeant l'intégrité du génome et fonctionnant de concert, tel que les mécanismes de réparation, de contrôle du cycle cellulaire ou de tolérance aux dommages (Hoeijmakers, 2009, 2001). L'instabilité du génome entre en cause dans l'étiologie du cancer chez les organismes multicellulaires eucaryotes, où une accumulation de dommages à l'ADN mène à des mutations pouvant causer un dérèglement cellulaire (Hoeijmakers, 2009, 2007).

La stabilité du génome est en cause lors du vieillissement (Hoeijmakers, 2007). En effet, l'étiologie de certaines maladies génétiques humaines causant un vieillissement prématuré, tel que les syndromes de Werner, Bloom et Rothmund-Thomson, provient de mutations dans des gènes importants pour le maintien du génome (Ellis *et al*, 1995; Kobayashi, 2011b).

Une instabilité au niveau du locus de l'ADNr, modèle d'étude utilisé lors de cette thèse, cause une réduction du nombre de générations qu'une levure mère peut effectuer avant d'entrer en sénescence (Kobayashi, 2011b; Ide *et al*, 2010; Kobayashi, 2011a). Par exemple, la délétion du gène *SIR2*, qui cause une augmentation de la recombinaison au niveau du locus ribosomal, diminue de moitié le nombre de générations possibles chez une cellule mère (Gottlieb & Esposito, 1989). À l'opposé, chez une souche *fob1Δ*, où une diminution de la recombinaison (et de la stabilité) dans l'ADNr est observée, les levures présentent une augmentation d'environ 60% du nombre de générations possibles (Kobayashi & Horiuchi, 1996; Takeuchi *et al*, 2003).

Dans cette section, nous discuterons des divers types de dommages à l'ADN ainsi que des méthodes utilisées par la cellule afin de les réparer. Les dommages causés par les rayons ultra-violets seront plus particulièrement abordés, puisque c'est cet agent endommageant l'ADN qui a été utilisé lors des travaux de cette thèse.

1.5.1 Dommages à l'ADN

Il est estimé qu'à l'intérieur d'une seule cellule de mammifère, 5 000 dommages de types oxydatifs sont présents en tout temps (Sander *et al*, 2005; Hoeijmakers, 2007) et des milliers de cassures simple brin sont aussi produites de façon journalière (Lindahl, 1993; Hoeijmakers, 2007). Les estimations de nombre de dommages présentés ci-haut sont calculées en ne prenant en ligne de compte que les sources endogènes. Conséquemment, il est possible qu'une cellule soit exposée à un nombre bien plus important de dommages si l'on considère les sources exogènes potentielles (Jackson & Bartek, 2009).

Les sources exogènes de dommage à l'ADN sont d'origines variées. En effet, certaines proviennent de l'activité humaine tandis que d'autres sont d'ordre environnementales. À la figure 17, diverses sources de dommage sont présentées, ainsi que les dommages causés et les mécanismes de réparation qui seront principalement utilisés afin de corriger ces dommages. Par exemple, les rayons-X, grandement utilisés en médecine, tant pour identifier une fracture osseuse, une pneumonie ou même pour directement traiter une tumeur cancéreuse, causent des dommages à l'ADN. Ces altérations sont principalement des cassures simple-brins, des modifications de bases ainsi que des cassures double-brins à l'ADN dans une moindre mesure (Preston, 2005). La toxicité des dommages au niveau cellulaire fut aussi utilisée à travers l'histoire de l'humanité à des fins plus pernicieuses : La Belgique fut le premier théâtre de l'utilisation militaire du gaz moutarde en 1917 (Jowsey *et al*, 2012). Sa toxicité provient du fait qu'il cause de fortes alkylations des bases, tant au niveau de la peau qu'il pénètre rapidement qu'au niveau des voies respiratoires (Jowsey *et al*, 2012). De plus, lors d'attaques oxydatives à l'ADN, la formation de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) est observée. Cette lésion est fortement mutagène lors de la réplication de l'ADN puisque le résidu endommagé peut autant s'apparier correctement avec un « C » ou, incorrectement, avec un « A » (Hoeijmakers, 2007), engendrant ainsi l'apparition de mutations suite à la réplication de l'ADN.

Une source plus fréquente de dommage à l'ADN, et plus difficilement évitable, provient de l'alimentation elle-même. Par exemple, des produits contaminés par les moisissures peuvent contenir de l'aflatoxine B1 ou de l'ochratoxine A (Ferguson & Philpott, 2008) et des produits surcuits peuvent contenir de l'acrylamide, dans le cas de fritures, ou des amines aromatiques hétérocycliques, lorsque de la viande est cuite à une température supérieure à 150°C (Ferguson & Philpott, 2008; Turesky, 2007). Ces dommages, causant des adduits volumineux à l'ADN (« *bulky adducts* ») seront réparés par le mécanisme de réparation par excision de nucléotides.

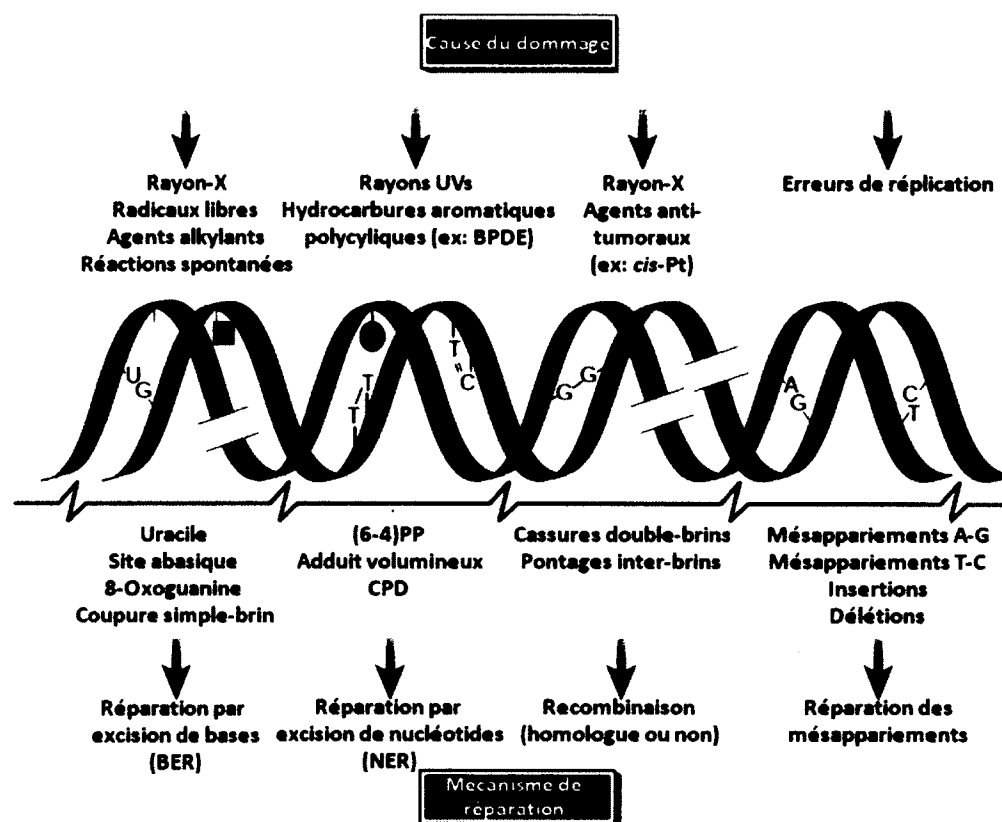


Figure 17 : Dommages et mécanismes de réparation. Divers agents endommageant l'ADN causeront une variété de dommages pouvant être réparés par quatre mécanismes de réparations. Figure traduite et adaptée de (Hoeijmakers, 2001).

Il est important de mentionner que les dommages à l'ADN vont tous causer une réponse cellulaire concertée afin de permettre leur réparation pour éviter d'engendrer l'apparition de mutations. En effet, l'une des conséquences de la présence de lésion est l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 18). Cet arrêt permet un temps de répit à la cellule afin d'effectuer la réparation. De plus, une grande majorité des dommages à l'ADN vont causer un arrêt de la transcription des polymérases à ARN et des fourches de réplifications (et donc des polymérases à ADN) ainsi que l'inhibition de la ségrégation des chromosomes (Hoeijmakers, 2001, 2007). Si la cellule n'est pas en mesure d'effectuer la réparation de ces dommages, elle entrera en apoptose (dans le cas des cellules humaines, car elle n'est pas prouvée chez *S. cerevisiae*). Alternativement, grâce à des mécanismes de tolérance, la

cellule peut éventuellement survivre, mais avec l'apparition probable de mutations ou d'aberrations chromosomiques (Jackson & Bartek, 2009; Hoeijmakers, 2009, 2001, 2007).

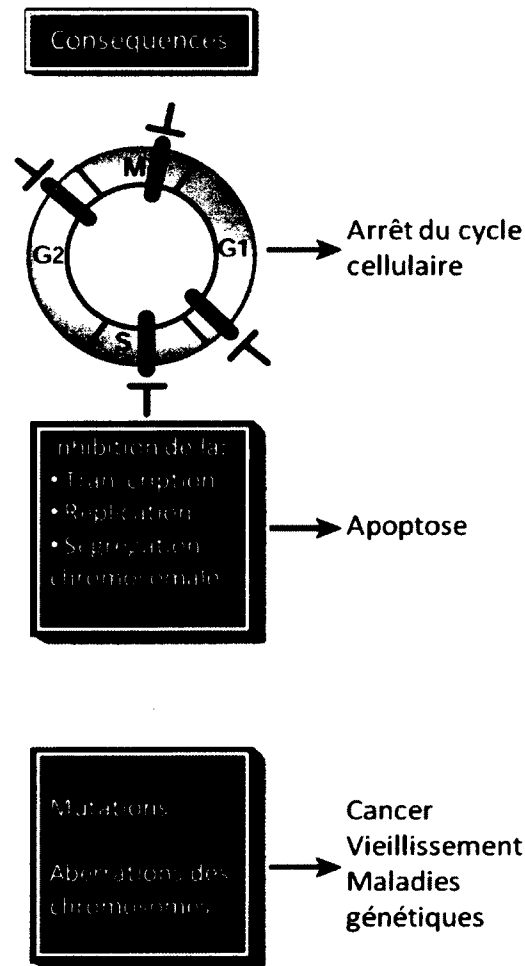


Figure 18 : Impacts des dommages sur le fonctionnement cellulaire. L'induction de dommage à l'ADN causera l'arrêt du cycle cellulaire (en haut) et des effets sur le métabolisme de la cellule (milieu). Les effets à plus long terme sont aussi présentés (bas). Figure traduite et adaptée de (Hoeijmakers, 2001).

1.5.1.1 Dommages causés par les rayons ultraviolets

La lumière solaire visible n'est qu'une infime partie de la quantité totale des ondes émises par le soleil. En fait, notre astre émet des rayons cosmiques, souvent nommé « vent solaire », composés principalement de protons qui seront déviés par le champ magnétique

terrestre. S'ils atteignaient la terre, les rayons cosmiques causeraient la destruction de la couche d'ozone (Rinsland *et al*, 2005). Cette couche d'ozone est essentielle à la survie des organismes vivants sur la terre : c'est grâce à elle que les rayons à grande force énergétique sont filtrés et n'atteignent pas la surface terrestre (Van der Leun, 2004; Batista *et al*, 2009). La lumière émanant du soleil est composée à 45% de rayons ultraviolets (UV). Ces rayons sont divisés en trois classes, selon leur longueur d'ondes : Les UVA ont une longueur d'onde allant de 320 à 400 nm, les UVB, de 295 à 320 nm et les UVC de 100 à 295 nm (Batista *et al*, 2009). Paradoxalement, la couche d'ozone elle-même est formée lors de l'absorption d'un rayon UVC par une molécule d'oxygène (O_2), qui formera l'ozone (O_3). Par la suite, la couche d'ozone absorbera la majorité du rayonnement solaire UVB, jusqu'à environ la longueur d'onde de 310 nm (Batista *et al*, 2009; van der Leun, 2004). Finalement, les longueurs d'ondes plus longues atteindront la croûte terrestre sans être absorbés par l'atmosphère.

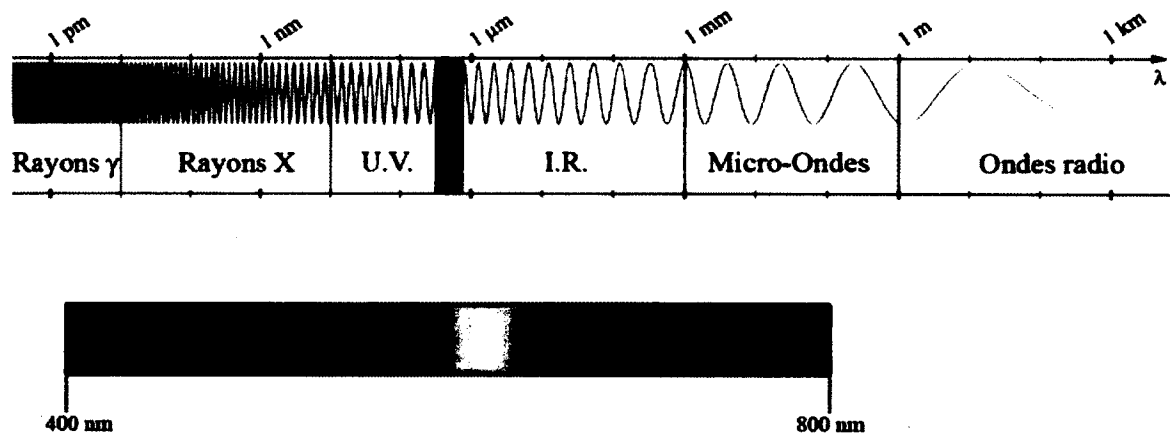


Figure 19 : Le spectre électromagnétique. La lumière visible, allant de la longueur d'onde de 400 nm à 800 nm, est une composante du spectre électromagnétique présenté ici en son ensemble. Image tirée et adaptée de: fr.wikiversity.org/wiki/notions_de_base_d'optique_ondulatoire/La_lumière,_une_ond_electromagnetique.

Suite à l'absorption par l'atmosphère et la couche d'ozone des particules hautement énergétique du soleil, le rayonnement solaire atteignant la surface planétaire est composé à 55% de rayons infrarouge (I.R.), 40% de lumière visible et 5% d'UV (figure 19). Malgré le fait que la majorité des rayons UV ne sont pas en mesure d'atteindre la surface terrestre, les rayons résiduels sont aptes à effectuer des réactions avec l'ADN cellulaire pour causer

environ 100 000 lésions par cellules par heure lors d'une exposition au soleil (Jackson & Bartek, 2009). Ces dommages vont causer une réaction inflammatoire, créant les érythèmes caractéristiques des « coups de soleil » et, s'ils ne sont pas réparés, causeront, à long terme, des cancers de la peau (Pfeifer & Besaratinia, 2012). Finalement, il est démontré que la variation de la couche d'ozone, tel que la dégradation de cette dernière par l'activité humaine, peut causer une augmentation de la quantité de radiation ultraviolette et de ses effets sur la santé humaine (Van der Leun, 2004).

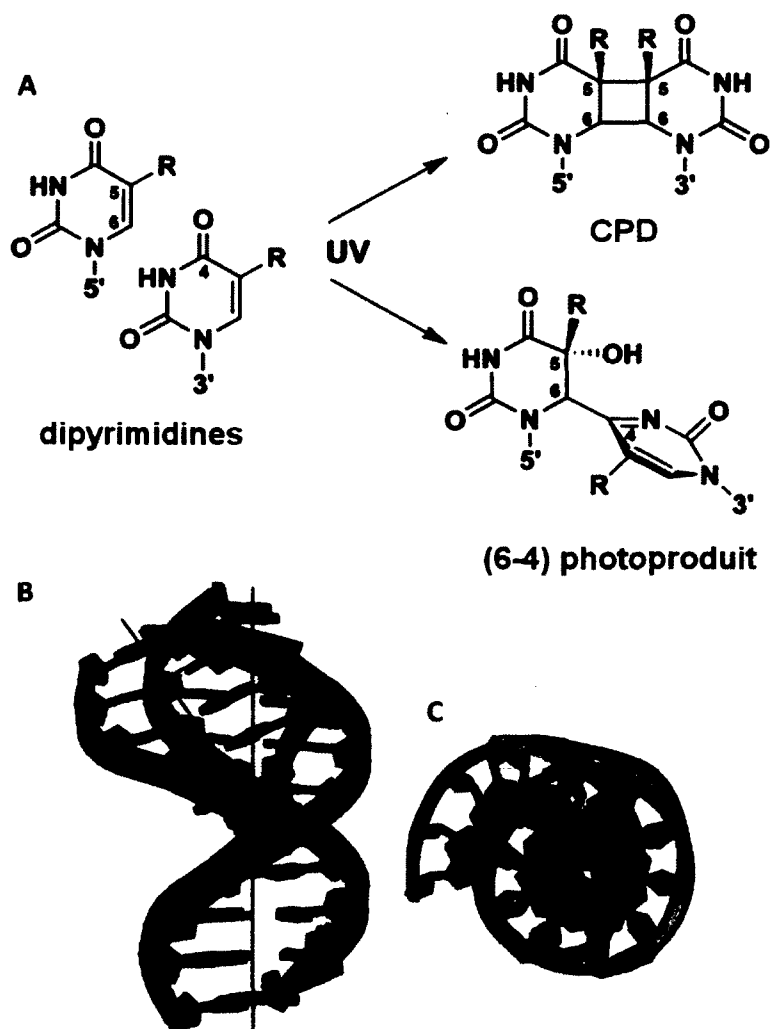


Figure 20 : Formation des dommages à l'ADN suite à une exposition aux rayons UVC et UVB. Sur le brin d'ADN, une séquence de deux pyrimidines adjacentes (A) absorbera l'énergie du rayon UVC ou UVB et une, ou deux, liaisons covalentes s'effectueront entre-elles. Il s'ensuivra donc la formation des dommages de type pyrimidine (6-4) pyrimidone lorsqu'un seul lien covalent s'effectue entre les deux bases et de type dimère cyclobutylique de pyrimidines (CPD) lorsqu'il s'en crée deux. La modification chimique de l'ADN

cause aussi une modification structurelle de cette dernière (B et C), coupe longitudinale en B et transverse en C. Par rapport à un double-brin d'ADN non-endommagé (ADN en vert), l'ADN comportant un CPD est physiquement dévié au niveau du dommage par un angle de 7° à 9° (ADN en rouge). Images tirées et adaptées des publications : (Park *et al*, 2002; Li *et al*, 2006b)

Les rayons UV de forte énergie, soit les UVC et UVB, seront absorbés efficacement par l'ADN puisque son pic d'absorption maximal est de 260 nm, une longueur d'onde correspondant aux UVC (Friedberg, 2011). Il s'ensuivra la formation de lésions à l'ADN au niveau des séquences contenant deux pyrimidines adjacentes (Figure 20). Ces dommages sont principalement de deux types : les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD) et les pyrimidines (6-4) pyrimidones (6-4PP) (Friedberg *et al*, 2006; Tremblay *et al*, 2009). Ces dommages sont formés dans l'ADN dans un ratio de 3 CPD pour 1 6-4PP (Mitchell & Nairn, 1989) lors d'une irradiation aux UVC. À l'opposé, lors d'analyses effectuées par irradiation à la lumière simulée, c'est-à-dire à l'aide d'un spectre imitant la lumière du jour, il se forme de 20 à 40 fois plus de CPD que de 6-4PP (Yoon *et al*, 2000). Quoi qu'il en soit, ces lésions ont toutes la particularité d'affecter la structure locale de l'ADN en induisant la formation d'un angle de 7° à 9° (Figure 20b et c), lors de la formation d'un CPD et d'un angle de 44° dans le cas du 6-4PP (Kim *et al*, 1995). En plus du rayon ultraviolet et de la répétition de deux pyrimidines, il s'avère nécessaire que l'ADN possède une certaine flexibilité afin de permettre la formation de ces dommages. Par exemple, il y a une augmentation de la quantité de dommages lorsque l'ADN est monocaténaire comparativement à une séquence identique bi-caténaire (Becker & Wang, 1989). De plus, certaines protéines s'attachant à l'ADN peuvent inhiber la formation de lésions en restreignant les mouvements des bases ou même faire l'inverse en permettant une plus grande liberté de mouvement (Becker & Wang, 1989; Meier & Thoma, 2005). À l'opposé, une rigidité locale de la molécule d'ADN causera une diminution des lésions étant donné que les deux pyrimidines adjacentes ne seront pas en mesure de s'aligner afin de réagir entre-elles (Friedberg *et al*, 2006). Finalement, l'identité des 2 bases pyrimidiques réactives est importante : il se produit plus de lésions de type CPD au niveau des séquences thymine-thymine ($T \diamond T$) que dans toutes les autres. Le ratio est de 68:16:13:3 pour les $T \diamond T$, les $T \diamond C$, les $C \diamond T$ et les $C \diamond C$ respectivement (Friedberg *et al*, 2006; Cadet *et al*, 2005).

Comparativement aux rayons UVC et UVB, relativement bien absorbés par les acides nucléiques, les rayons de moindre énergie UVA ne sont pas absorbés efficacement par l'ADN. Néanmoins, il a été démontré, hors de tout doute, qu'une exposition à ces rayons cause toutefois des lésions CPD à l'ADN, tant chez les bactéries que chez les cellules humaines, en plus forte mesure que les dommages de type photooxydatifs (Cadet *et al*, 2005; Rochette *et al*, 2003; Douki *et al*, 2003; Tyrrell, 1973; Mouret *et al*, 2006). Comparativement à une irradiation aux UV à forte intensité, les CPD formés par les UVA seront principalement restreints aux séquences T◊T (Rochette *et al*, 2003). Par contre, l'irradiation aux UVA ne causera toutefois pas de 6-4PP (Cadet *et al*, 2005; Banyasz *et al*, 2011). Il semblerait que la formation de dommages CPD suite à une irradiation UVA serait dû à l'action d'un photosensibilisateur présent à l'intérieur des cellules, qui reste, jusqu'à maintenant, inconnu (Cadet *et al*, 2005; Douki *et al*, 2003). Toutefois, des travaux récents semblent démontrer que l'ADN bi-caténaire est en mesure d'absorber directement les rayons UVA de plus de 320 nm et de, par la suite, former des dimères T◊T. Ces observations vont à l'encontre de l'hypothèse d'un photosensibilisateur présent à l'intérieur des cellules, puisque ces expériences furent effectuées dans des solutions salines (Banyasz *et al*, 2011; Cadet *et al*, 2005). Néanmoins, les CPD causés par les rayons UVA semblent persister plus longtemps dans l'ADN des cellules humaines que les mêmes lésions causées par des UVB (Mouret *et al*, 2006; Mathonnet *et al*, 2003).

La prévalence des cancers de la peau est principalement due à l'exposition aux rayons UV et elle est en constante augmentation (Cadet *et al*, 2005; Pfeifer & Besaratinia, 2012). Les dommages CPD sont particulièrement importants au niveau de l'étiologie des cancers de la peau, puisque ces lésions causent des mutations C → T ou CC → TT au niveau des régions contenant deux pyrimidines adjacentes. L'un des exemples les plus clairs est la grande proportion de ces types de transitions au niveau du gène p53 détecté lors de cancers de la peau (Mouret *et al*, 2006; Pfeifer & Besaratinia, 2012; Mathonnet *et al*, 2003). La faible quantité de mutations aux sites T◊T s'explique par le fait qu'il existe une polymérase à ADN apte à correctement incorporer 2 adénines en face du dimère T◊T. Ce processus, nommé *synthèse translésion*, s'opère grâce à la polymérase à ADN η (η),

encodée par le gène RAD30 chez *S. cerevisiae* et le gène XPV chez l'humain (Pfeifer & Besaratinia, 2012; Johnson *et al*, 1999).

Il existe d'autres types de lésions à l'ADN causées par les rayons ultraviolets. L'une des plus fréquentes, après les lésions CPD, est l'oxydation de la guanine en 8-oxodGuo par les UVA. Ce dommage, fréquent dans l'ADN, est issu de réactions avec des radicaux libres (Cadet *et al*, 2005). De plus, les rayons UV causent des cassures simple-brin, des déaminations et des pontages entre l'ADN et des protéines en faible quantité (Cadet *et al*, 2005). Finalement, il est important de noter qu'une irradiation aux rayons UVA et UVB peut affecter d'autres molécules. Par exemple, la peroxydation de lipides (le malondialdéhyde et le 4-hydroxynoneral sont deux produits d'une telle réaction), par une réaction avec des radicaux libre, et ces derniers pourront, par la suite, réagir avec l'ADN afin de générer des adduits lipides-ADN (Cadet *et al*, 2005; Batista *et al*, 2009). Par contre, les conséquences biologiques de ces lésions restent à définir, malgré le fait qu'elles semblent en mesure de causer des mutations et d'augmenter la carcinogénèse (Batista *et al*, 2009).

1.5.1.2 Dommages ultraviolets et chromatine

Le contexte cellulaire implique que les lésions à l'ADN se forment tout en interagissant, directement ou indirectement, avec le milieu protéique entourant l'ADN. L'effet de la chromatine sur les dommages CPD et 6-4PP est surtout engendré par les contraintes de mouvements imposées à la molécule d'ADN. Malgré le fait que ces lésions causent une distorsion de l'ADN, elles n'engendrent pas d'effet majeurs sur la stabilité de la chromatine en tant que telle (Smerdon & Conconi, 1998). Par contre, la courbure causée par les dommages peut modifier certaines interactions entre l'ADN et des protéines, telles que des facteurs de transcription, ainsi que d'affecter le positionnement de nucléosomes (Suquet & Smerdon, 1993; Meier & Thoma, 2005).

Il existe un impact clair des nucléosomes au niveau de la formation des lésions 6-4PP. Ces dommages seront limités à la région de l'ADN de liaison, les nucléosomes inhibent donc la formation de ce type de dommage. À l'opposé, ce biais, entre l'ADN de liaison et l'ADN nucléosomal, au niveau de la formation de lésion est absent pour les CPD : leur distribution est considérée aléatoire (Mitchell *et al*, 1990; Suquet *et al*, 1995; Niggli & Cerutti, 1982). Malgré la distribution aléatoire des CPD, ces derniers présentent une certaine régularité lorsqu'ils sont induits à l'intérieur des nucléosomes (Figure 21). En effet, une périodicité de 10,3 bases par tour est observable. Cette périodicité, similaire à celle observée lors de digestions à la DNase I, reflète le fait que les CPD sont plus facilement induits aux positions nucléotidiques les plus éloignées de la surface des histones (Gale & Smerdon, 1988; Gale *et al*, 1987). La modulation de ces lésions à l'intérieur du nucléosome s'explique par le fait que la courbure de la molécule d'ADN inhibe et favorise successivement la formation de CPD. Une expérience clef démontrant l'effet de la courbure fut l'utilisation d'un fragment d'ADN nu de 52 pb contenant deux séquences capables de se lier au répresseur λ qui fut ajouté afin de forcer la formation d'une courbure similaire à celle induite par un nucléosome. Suite à l'induction de lésions par une irradiation aux rayons UVC, ils observèrent une périodicité de formation de dommage de 10 bases (Pehrson & Cohen, 1992).

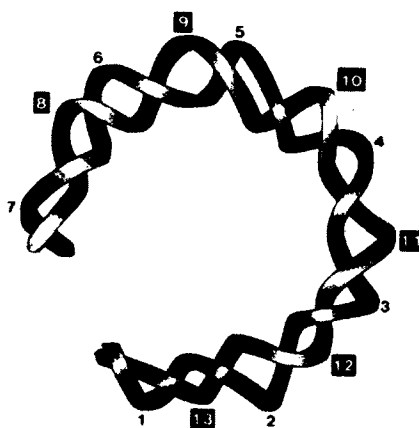


Figure 21 : Distribution nucléosomale des CPD. Le pic de positionnement de CPD sur l'ADN enroulé autour d'un nucléosome est dénoté par un chiffre noir ou blanc (brin 5' et 3' respectivement – Figure adaptée de Gale & Smerdon, 1988).

1.5.1.3 Dommages ultraviolets et leurs effets sur la transcription

L'un des effets les plus importants des lésions à l'ADN causées par les rayons UV est l'impact majeur au niveau de la transcription et de la synthèse de l'ADN par les diverses polymérases. En effet, il est démontré que les dommages CPD et 6-4PP causeront l'arrêt des polymérases, tant à ADN qu'à ARN, au niveau de la lésion (Friedberg *et al*, 2006; Mei Kwei *et al*, 2004; Donahue *et al*, 1994). Dans les sections subséquentes, l'effet d'une polymérase à ARN bloquée à un site de dommage sur les mécanismes de réparation sera abordé. La polymérase bloquée sera un signal de recrutement de la machinerie de réparation, tant pour la polymérase à ARN I que la II (Conconi *et al*, 2002; Tornaletti & Hanawalt, 1999; Tornaletti *et al*, 1997).

L'arrêt des polymérases à ARN II fut relativement bien étudié comparativement à l'effet sur la pARN-I et il fut démontré que l'arrêt de la pARN-II au niveau du dommage était causé par la mauvaise incorporation d'un nucléotide en face de la lésion (Mei Kwei *et al*, 2004; Brueckner *et al*, 2007). Une fois bloquée au site de lésion, la pARN-II empêche l'accès au dommage par la machinerie de réparation. Par exemple, la photolyase (définie dans la section 1.5.3.1), une enzyme capable de réparer un CPD à elle-seule, n'est pas en mesure d'effectuer la réparation lorsqu'une pARN-II est bloquée au site de dommage (Donahue *et al*, 1994; Livingstone-Zatchej *et al*, 1997). À l'opposé, les travaux du Dr. Fritz Thoma ont démontré que la photolyase est en mesure de réparer efficacement de brin transcrit par la pARN-I au niveau de l'ADNr (Meier *et al*, 2002). Cette observation suggère donc une différence au niveau de la stabilité de la pARN-I par rapport à la pARN-II lorsqu'elle est bloquée à un site de CPD, ce qui sera abordé au Chapitre 2.

L'une des seules études disponible sur l'impact d'une collision entre une polymérase bloquée avec une polymérase en amont lors d'une forte transcription fut celle du groupe de recherche du Dr. Martin (Zhou & Martin, 2006). Lors de leurs travaux, ils utilisèrent comme modèle une polymérase à ARN T7 (pT7) bloquée sur un brin d'ADN attaché à une bille. Une fois la première pT7 bloquée, les billes furent lavées (tout en conservant les pT7 liées) et une seconde ronde de transcription fut entamée. Cette seconde polymérase, à

l'arrière de la première, expulsera la polymérase arrêtée afin de la remplacer au site d'arrêt et d'être elle-même bloquée (Zhou & Martin, 2006). Lors des travaux tentant de démontrer le destin des pARN-I bloquées aux lésions (Chapitre 2), une hypothèse similaire aux observations du Dr. Martin a été émise.

Afin de permettre l'accès aux dommages, un relâchement de la pARN-II des sites endommagés fut observé chez la bactérie (Selby & Sancar, 1994). À l'opposé, un recul de la pARN-II, afin de permettre à la transcription de continuer suite à la réparation du dommage, fut démontré *in vitro*, chez l'humain, précédemment (Tornaletti *et al*, 1997; Tornaletti & Hanawalt, 1999).

Il est toutefois démontré que la pARN-II est en mesure de transcrire à travers et au-delà de certaines lésions. Par exemple, lors de la rencontre d'un 8-oxodGuo, il est possible qu'il y ait addition d'une adénine échappant aux processus de révision (« *proofreading* »), causant ainsi une mutation transcriptionnelle au niveau de l'ARN ainsi généré (Damsma & Cramer, 2009). Jusqu'à tout récemment, certaines preuves expérimentales laissaient sous-entendre qu'une lésion de type CPD ne causait pas un arrêt complet de la transcription et qu'une très faible quantité de polymérases poursuivait la transcription au-delà du dommage, mais le mécanisme sous-jacent restait peu défini (Mei Kwei *et al*, 2004; Marietta & Brooks, 2007; Lee *et al*, 2002). Des travaux très récents démontrent maintenant l'existence d'un mécanisme de transcription à travers et au-delà des lésions CPD chez *S. cerevisiae* (Walmacq *et al*, 2012; Ellenberger, 2012). Ces travaux démontrent la présence d'une transcription translésionnelle (TTL) où il y a addition préférentielle de deux adénosines à l'opposé d'un dimère cyclobutylique de pyrimidine. Par contre, suite à l'addition d'un mauvais nucléotide, la pARN-II sera irrémédiablement bloquée à la lésion (Mei Kwei *et al*, 2004; Walmacq *et al*, 2012). Finalement, cette transcription translésionnelle est dépendante d'une protéine impliquée dans la réparation des lésions CPD, Rad26p, et semble être relativement peu fréquente (Walmacq *et al*, 2012).

Au niveau de l'effet des CPD sur la transcription par la pARN-I, les recherches sont peu nombreuses. Toutefois, il a été démontré que les CPD semblent bloquer la transcription

de cette polymérase étant donné qu'il y a inactivation des gènes ribosomaux, par déposition de nucléosomes, et une forte diminution de la transcription des gènes de l'ARNr en absence de réparation suite à l'induction de lésions par UVC (Conconi *et al*, 2005). Ces observations, ayant le mérite d'avoir été effectuées *in vivo*, sont toutefois circonstanciées, malgré le fait qu'elles appuient l'hypothèse que les pARN-I sont bloquées aux sites de dommages. D'ailleurs, il a été démontré, *in vitro*, qu'une pARN-I bloquée à un CPD possède une demie-vie de près de 3 heures (Figure 6 de l'article de Hara *et al*, 1999). De plus, l'impact d'une collision d'une polymérase à ARN I en amont d'une pARN-I arrêtée par une lésion est un sujet inexploré. Les réponses à ces questions étant inconnues, des études additionnelles furent effectuées lors de cette thèse afin d'élucider l'impact d'une rencontre entre un CPD et la pARN-I et les résultats sont présentés au Chapitre 2.

1.5.1.4 Pourquoi causer des dommages par UVC lors de nos recherches?

L'étude des dommages causés par les rayons ultraviolets s'effectue depuis longtemps. En effet, les premières études reliées au maintien du génome et à la réparation de l'ADN ont été effectuées sur les dommages causés par ces rayons avec comme modèle *Escherichia coli* (Friedberg, 2011; Friedberg *et al*, 2006; Setlow & Carrier, 1964). L'utilisation des UVC en laboratoire possède bien des avantages, malgré le fait qu'une telle irradiation ne correspond pas aux conditions terrestre normales. Premièrement, le spectre d'émission des lampes au mercure est très étroit et précis comparativement aux lampes émettant des rayons UVA ou UVB, ce qui simplifie l'analyse des résultats obtenus. De plus, les lésions principalement causées par les UVC sont les CPD et les 6-4PP dans un ratio de 80% et de 20% respectivement, aussi présentes lors d'une exposition à la lumière solaire (Mitchell & Nairn, 1989; Tremblay *et al*, 2009). Ces lésions sont efficacement et rapidement induites par l'utilisation de lampes germicides, possédant un spectre d'émission maximal de 254 nm (UVC), ce qui est proche de la longueur d'onde d'absorption maximale de l'ADN de 260 nm. Finalement, les UVC sont efficacement absorbés par l'ADN et très peu par les autres macromolécules présentes dans une cellule (Cadet *et al*, 2005; Friedberg *et al*, 2006). Il est important de noter que malgré le fait que les lésions sont induites par les UVC,

normalement filtrés par l'atmosphère, les lésions ainsi obtenues et leur analyse sont d'une importance biologique sans équivoque, puisqu'elles se retrouvent au niveau cellulaire suite à une exposition solaire.

1.5.2 Les mécanismes de réparation de l'ADN

Étant donné la diversité et la multiplicité des lésions à l'ADN, plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN ont vu le jour à travers l'évolution afin de pallier rapidement et efficacement aux dommages (résumés à la Figure 17). Ces mécanismes sont hautement conservés de la bactérie à l'homme : malgré les différences parfois très importantes au niveau des protéines impliquées, le fonctionnement global demeure similaire (Hoeijmakers, 2001). Dans cette section, les mécanismes de réparation étant moins impliqués lors de l'induction de dommages par les UVC seront présentés succinctement. Le mécanisme de réparation impliqué lors de la réparation de dommages spécifiquement causés par les UVC sera présenté plus exhaustivement dans la section subséquente (section 1.5.3).

1.5.2.1 Réparation par excision de bases (BER)

La réparation par excision de bases (BER – « *Base Excision Repair* ») est un mécanisme impliqué lorsqu'une base est endommagée. Dans un premier temps, une protéine initiera le début de la réparation en catalysant l'hydrolyse du lien reliant la base endommagée au désoxyribose, formant ainsi un site abasique. Les protéines clivant ces bases sont nommées glycosylases à ADN et sont généralement spécifiques pour un type de lésion. Par exemple, Ogg1p est la glycosylase catalysant la formation d'un site abasique au niveau des lésions 8-oxodGuo (Nash *et al*, 1996). Par la suite, une endonucléase spécifique aux sites abasiques prendra le relais afin de cliver le brin d'ADN lésé, créant une incision simple brin dans la molécule. La réparation complète de la lésion s'effectuera suite à la synthèse d'un petit fragment d'ADN, grâce à l'utilisation du brin complémentaire comme matrice, et sa ligation afin de reformer un brin d'ADN ininterrompu (Friedberg *et al*, 2006).

1.5.2.2 Jonction des extrémités non-homologues et recombinaison homologue

Les cassures double-brins de l'ADN sont difficiles à réparer adéquatement. En effet, une fois la cassure effectuée, les deux brins résultants de la cassure doivent être correctement identifiés afin que les bouts soient joints. Un tel dommage est considéré comme étant extrêmement cytotoxique et leur réparation est capitale afin de permettre la survie cellulaire (Symington & Gautier, 2011). Conséquemment, ce mécanisme de réparation, complexe, nécessite énormément d'énergie, soit plus de 10^4 molécules d'ATP, qui seront impliquées dans les processus de signallement et de réparation (Hoeijmakers, 2009).

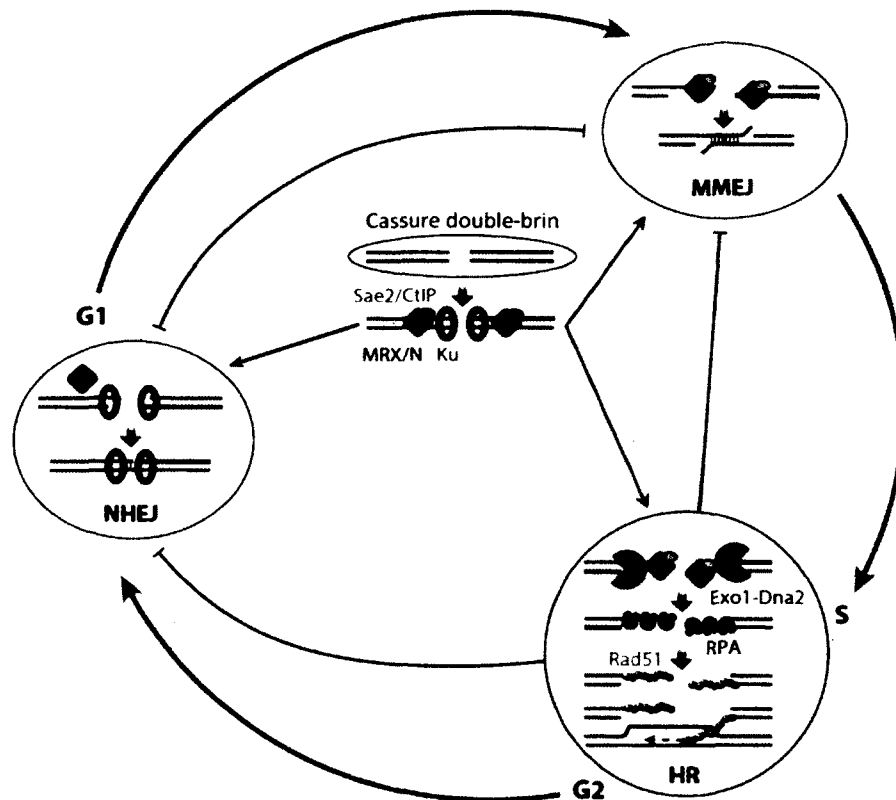


Figure 22 : Mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN. Les trois modes de réparation des cassures double-brins sont régulés dans le cycle cellulaire et, une fois initié, un mode de réparation inhibe les deux autres au niveau de la cassure (lignes rouges). La jonction des brins non-homologues (NHEJ) s'effectue principalement en phase G1 du cycle cellulaire, tandis que la recombinaison homologue (HR) est favorisée en phase S et G2. De son côté, la jonction médiée par micro-homologie (MMEJ) est active à travers le cycle cellulaire (flèches grises). Figure traduite et adaptée de (Symington & Gautier, 2011)

Depuis longtemps, la littérature scientifique décrivait principalement deux sous-voies permettant la réparation des cassures. La première, surtout effectuée lors de la phase G1 du cycle cellulaire, est la réparation par jonction des brins non-homologues (NHEJ – « *Non-Homologous End-Joining* ») et la seconde, principalement active lors des phases S et G2, se nomme la recombinaison homologue (HR – « *Homologous Recombination* ») (Friedberg *et al*, 2006; Symington & Gautier, 2011). Récemment, une troisième voie de réparation, qui était précédemment vue comme accessoire et très peu utilisée, fut mise à l'avant plan des recherches : la voie de la jonction médiée par micro-homologie (MMEJ – « *Microhomology-Mediated End Joining* ») (McVey & Lee, 2008; Symington & Gautier, 2011; Crespan *et al*, 2012). Ces voies sont sommairement définies à la Figure 22.

Lors de la NHEJ, les hétérodimères KU s'attachent aux bouts des deux cassures afin de permettre leur rapprochement, de par l'action d'une protéine kinase et d'une ligase, une réparation de la cassure aura lieu (Friedberg *et al*, 2006). Ce mode de réparation cause fréquemment des insertions ou des délétions d'un à quatre nucléotides au niveau de la séquence (McVey & Lee, 2008). Lorsque les cassures présentent des bouts francs ou des extrémités non-cohésives, la MMEJ est plus efficace que la NHEJ chez *S. cerevisiae* (McVey & Lee, 2008). À l'opposé de la NHEJ, cette voie de réparation ne nécessite pas les protéines KU, mais cause, tout comme cette dernière, l'ajout ou la disparition de quelques nucléotides.

Comparativement à ces deux mécanismes, la recombinaison homologue est une voie de réparation fidèle, puisqu'elle utilise la seconde copie du chromosome comme matrice afin de corriger la cassure. Chez la levure, la recombinaison est initiée par la dégradation des deux brins d'ADN par une exonucléase 5' → 3'. Ensuite, les extrémités simple-brin seront recouvertes d'un filament de Rad51p grâce à l'action de plusieurs protéines, dont Rad52p (Shinohara *et al*, 1992; Symington, 2002). Le brin d'ADN ainsi recouvert sera en mesure d'effectuer l'invasion du chromosome homologue afin que la machinerie de réplication de l'ADN puisse synthétiser de nouveau la séquence manquante (Friedberg *et al*, 2006; Symington & Gautier, 2011). Il est important de mentionner que la perte du gène *RAD52* cause une abrogation de la recombinaison homologue et, par conséquent, une sensibilité

accrue des levures aux agents causant de telles lésions (Symington, 2002). De plus, tel que mentionné précédemment, les protéines impliquées lors de la recombinaison sont séquestrées à l'extérieur du nucléole, étant donné la structure répétitive du locus des gènes de l'ARNr afin d'éviter des événements de recombinaison non désirés (Taddei *et al*, 2010).

1.5.2.3 Réparation des mésappariements (MMR)

Tout comme les autres modes de réparation, le mécanisme de réparation des mésappariements (MMR – « *MisMatch Repair* ») protège les cellules de mutations causées par une réplication de l'ADN erronée. En fait, la MMR fonctionne de concert avec les polymérases à ADN possédant une activité de correction (« *proofreading* ») afin que la réplication de l'ADN puisse s'effectuer avec une grande fidélité, de l'ordre de 10^{-10} mutations par paire de bases lors d'une division cellulaire. Par contre, la perte de ce système de réparation cause une augmentation des erreurs d'environ mille fois lors de la synthèse d'ADN (Preston *et al*, 2011).

1.5.3 La réparation des lésions induites par les UVC

Lors des premières études, dans les années 1940s, deux méthodes de réparation avaient été observées suite à l'induction de lésions à l'ADN par les rayons UVC : la réparation lumière-dépendante et lumière-indépendante (Friedberg, 2011). Maintenant que leurs mode d'action sont mieux définis, ces mécanismes portent le nom de « photoréactivation » et de réparation par excision de nucléotides (NER – « *Nucleotide Excision Repair* »).

1.5.3.1 Réparation par photoréactivation

Le terme photoréactivation est utilisé pour définir le mode de réparation des dommages par une classe d'enzyme nommée « photolyase », qui sont spécifiques, soit aux CPD ou aux

6-4PP. Cette réparation, lumière-dépendante, fut identifiée en un premier temps chez *Streptomyces griseus*, puis chez *Escherichia coli* avant d'être ensuite identifiée chez la levure (gène *PHR1* - Sancar, 2008). Chez les mammifères placentaires, tel que l'homme, il n'existe pas de photolyase. Par contre, une protéine à la séquence très similaire est présente et est responsable de l'instauration du cycle circadien (Leloup & Goldbeter, 2008; Sancar, 2008).

Chez la levure *S. cerevisiae*, il existe une seule photolyase, encodée par le gène *PHR1*, et elle répare les dommages CPD (Green & MacQuillan, 1980). Comparativement à la réparation lumière-indépendante, qui s'appelle la réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation par la photolyase est très rapide et ne nécessite que l'enzyme elle-même, un cofacteur (le FADH) et un rayon de lumière d'une longueur d'onde correspondant au bleu (Sancar, 2004). La grande efficacité et rapidité de la photolyase à réparer les lésions CPD chez la levure est impressionnante. Par exemple, lors d'études de la réparation par cette enzyme au niveau du locus de l'ADNr, il fut démontré que 50% des dommages étaient réparés après seulement 20 minutes d'exposition à la lumière bleutée suite à une induction de lésions par UVC chez *S. cerevisiae* (Meier *et al*, 2002). Finalement, la photolyase, une fois attachée à un dommage, potentialise la réponse par la réparation par excision de nucléotides, le second mécanisme de réparation apte à réparer de telles lésions (Sancar & Smith, 1989). Conséquemment, les études portant sur la NER sont effectuées en présence unique de lumière jaune, afin d'éviter d'activer ce mode de réparation sans toutefois retirer le gène codant pour cette protéine.

1.5.3.2 Réparation par excision de nucléotides (NER)

Initialement identifiée chez la bactérie *Escherichia coli* dans les années 1960s par les groupes de recherche des Dr. Setlow et Hanawalt, ce mécanisme de réparation est présent chez tous les organismes, allant des procaryotes aux eucaryotes (Friedberg, 2011; Setlow & Carrier, 1964; Pettijohn & Hanawalt, 1964). La compréhension du mécanisme d'action de la NER fut grandement améliorée par l'identification de cellules de fibroblastes présentant

des déficiences au niveau de la réparation de lésions induites par les rayons UV (DiGiovanna & Kraemer, 2012; Cleaver, 1968). Ces cellules provenaient de patients souffrant d'une maladie autosomale rare, *Xeroderma Pigmentosum* (XP). Cette maladie, initialement décrite en 1874, est caractérisée par une très forte augmentation des risques de cancers de la peau exposée au soleil ainsi qu'une augmentation plus modeste, de l'ordre d'environ 50 fois, de cancers cérébraux (DiGiovanna & Kraemer, 2012). Ce mode de réparation possède la particularité d'être très polyvalent : au-delà des dommages causés par les rayons UV, des lésions causées par des agents chimiques hautement mutagènes présents dans la fumée de cigarette (ex : BPDE), des agents chimiothérapeutiques (ex : cisplatine) et divers types de larges adduits à l'ADN sont réparés par ce système. Cette polyvalence s'explique en grande partie par la particularité du mode de détection des dommages (Min & Pavletich, 2007).

Chez la levure, le processus général de la NER est bien connu, grâce aux travaux dans des systèmes *in vitro* (Prakash & Prakash, 2000). Ces travaux ont mené à la création de deux classes de gènes : les gènes de classe 1 (*RAD1*, *RAD2*, *RAD3*, *RAD4*, *RAD10*, *RAD14* et *RAD25*), absolument requis à la réaction de NER et les gènes de classe 2 (*RAD7*, *RAD16*, *RAD23* et *MMS19*), d'une utilité plus accessoire dans ce système. Selon leur importance, leur délétion cause une forte sensibilité aux rayons UV, pour les gènes de classe 1, ou une sensibilité plus marginale aux UV, pour les gènes de classe 2 (Prakash & Prakash, 2000). La NER possède deux sous-voies, ces voies ne se différencient que de par la méthode de détection du dommage à l'ADN (Figure 23). Lorsqu'une lésion est directement détectée dans le génome endommagé, la sous-voie impliquée se nomme la réparation globale du génome (GG-NER – « *Global Genome Nucleotide Excision Repair* »). Cette voie répare l'ADN non-transcrit ainsi que le brin non-transcrit d'un gène actif (Conconi, 2005). La seconde voie de réparation de la NER emploie avec efficacité les polymérases à ARN bloquées aux sites de lésions afin de permettre le recrutement de la machinerie de réparation. Cette voie est nommée la voie de réparation couplée à la transcription (TC-NER – « *Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair* ») et répare plus rapidement les dommages que la GG-NER (Prakash & Prakash, 2000).

Suite à la détection de la lésion, le mécanisme de réparation et les protéines impliquées seront les mêmes. Pour cette raison, dans la prochaine section, le mécanisme de GG-NER sera décrit de façon plus exhaustive que la TC-NER, pour lequel seul le mode de détection de la lésion sera abordé.

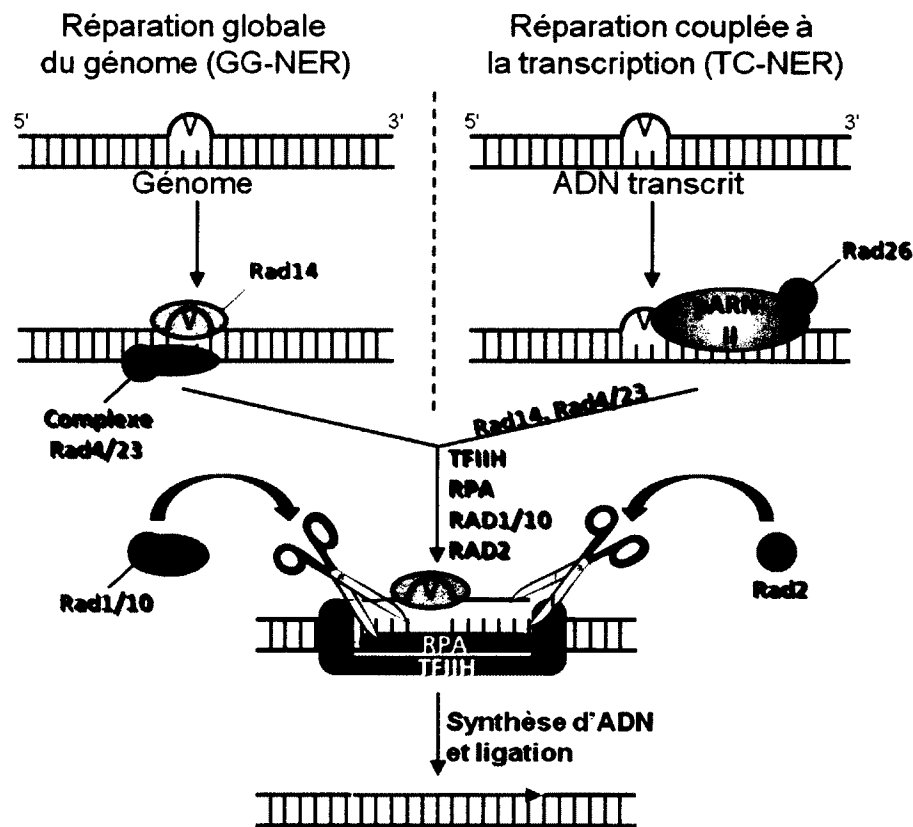


Figure 23 : Schéma des voies de réparation par excision de nucléotides. La NER possède deux sous-voies, n'ayant pour différence que le mode de détection de la lésion. Dans un premier cas, la lésion peut être directement détectée par le complexe Rad4/23p et Rad14p, un processus nommé la réparation globale du génome. La seconde option est celle où la lésion cause l'arrêt d'une polymérase à ARN II, cet arrêt sera détecté par la protéine Rad26p; ce processus est nommé la réparation couplée à la transcription. Les étapes de la NER sont définies dans le texte.

1.5.3.3 Réparation globale du génome (GG-NER)

La réparation globale du génome est initiée par la détection de l'instabilité locale du double-brin d'ADN causée par une lésion, car celle-ci réduit le nombre de liens hydrogènes

entre les bases. La détection de la lésion sera dépendante du complexe protéique Rad4/23/33p (Min & Pavletich, 2007). En fait, la protéine Rad4p, contenant l'activité de liaison à l'ADN, se liera au brin d'ADN opposé à la lésion afin de pousser les 2 bases endommagées à l'extérieur de l'hélice double-brin (Min & Pavletich, 2007). Conjointement au recrutement du complexe Rad4/23/33p, la protéine Rad14p sera recrutée au site de lésion afin d'en confirmer la présence d'un dommage et de discriminer le brin contenant la lésion (Bankmann *et al*, 1992). En fait, c'est ce mécanisme d'action, indépendant de la structure de la lésion en tant que telle, qui explique pourquoi la NER est en mesure de détecter, et de réparer, un large spectre de type de dommage. L'arrivée subséquente de TFIIH permettra, grâce à l'activité hélicase des sous-unités Ssl2p et Rad3p, l'ouverture du double-brin d'ADN afin de permettre aux endonucléases Rad1/10p et Rad2p d'effectuer un clivage simple-brin en 5' et en 3' respectivement. Récemment, il a été démontré que l'endonucléase Rad1/10p est présente en complexe avec Rad14p à l'intérieur de la levure, ce qui permet le recrutement efficace de cette endonucléase aux sites de lésions (Guzder *et al*, 2006; Mardiros *et al*, 2010). Suite aux deux incisions, un oligonucléotide, d'une taille allant de 25 à 30 nucléotides et contenant les bases endommagées, sera excisé du brin d'ADN pour qu'ensuite la brèche soit complétée par synthèse d'ADN, en utilisant le brin non-endommagé comme matrice (Prakash & Prakash, 2000; Huang *et al*, 1992). La dernière étape consiste à effectuer la ligation du brin nouvellement synthétisé afin d'obtenir une molécule d'ADN ininterrompue. De plus, il fut démontré *in vitro* que la taille minimale du substrat pouvant permettre le recrutement complet de la machinerie NER est d'approximativement 100 pb (Huang & Sancar, 1994).

De façon générale, la délétion de l'un des gènes encodant l'une des protéines décrites ci-haut causera une abrogation totale de la réparation, étant donné que les étapes de réparation sont partagées par les 2 sous-voies de la NER. Par exemple, la délétion de *RAD1*, *RAD10*, *RAD14* ou *RAD4* empêche la NER de procéder (Guzder *et al*, 2006; Prakash & Prakash, 2000; Verhage *et al*, 1996). Par contre, chez *S. cerevisiae*, la délétion de *RAD4* ne cause pas une abrogation totale de la NER. La présence vestigiale de réparation chez une souche *rad4Δ* fut observée dans une seule région du génome : au niveau du locus de l'ADNr. La réparation observée était de l'ordre de 50% au niveau de la séquence du

gène de l'ARNr (Verhage *et al*, 1996; den Dulk *et al*, 2005). Par contre, les analyses du groupe de recherche du Dr. Brouwer ne séparaient pas les deux populations de gènes de l'ARNr afin de clairement expliquer le phénomène observé. L'hypothèse qu'ils émirent fut qu'il existait soit, 1) un mode de réparation spécifique à l'ADNr ouvert, par rapport à l'ADNr fermé, ou 2) la présence de réparation couplée à la transcription spécifique à la polymérase I. Dans des travaux subséquents, ils identifièrent une seconde protéine, ayant une forte homologie de séquence au produit du gène *RAD4*, encodé par *YDR314C*, qu'ils renommèrent *RAD34* (Den Dulk *et al*, 2005). De plus, ils confirmèrent que cette protéine était, elle aussi, présente dans un complexe composé de Rad23p et de Rad33p (tout comme Rad4p est en complexe avec ces 2 protéines). Enfin, ils démontrèrent qu'une double délétion des gènes *RAD4* et *RAD34* abolissait totalement la NER dans les gènes ribosomaux (Den Dulk *et al*, 2005). Encore une fois, leurs conclusions furent limitées par le fait qu'ils ne séparaient pas les 2 populations d'ADNr. Afin de mieux comprendre l'effet des produits des gènes *RAD4* et *RAD34*, les travaux du chapitre 1 de cette thèse ont porté sur la séparation de ces 2 populations d'ADNr chez des souches mutantes pour ces 2 gènes afin d'observer l'implication des complexes Rad4/23/33p et Rad34/23/33p au niveau de la NER.

Finalement, il est important de mentionner que le modèle de la GG-NER décrit ci-haut ne prend pas en considération le fait que la réparation s'effectue dans un contexte cellulaire, tout en interagissant avec les structures locales de la chromatine. L'impact de la chromatine au niveau de la NER sera discuté plus loin (section 1.5.3.5), mais il est important de définir le rôle capital qu'effectue *in vivo* le complexe Rad7/16-Abf1p sur la GG-NER (Reed *et al*, 1999; Verhage *et al*, 1994; Bang *et al*, 1992). Dans ce complexe, Rad16p possède une activité de remodelage de la chromatine, car elle est membre de la superfamille des Swi2/Snf2, ainsi qu'une activité ATPase stimulée par la présence de chromatine (Guzder *et al*, 1998). Abf1p serait quant à elle impliquée au niveau du recrutement du complexe sur l'ADN au niveau des séquences ARS pour que le complexe puisse ensuite glisser sur l'ADN afin d'arriver à des sites de lésions (Yu *et al*, 2009). Selon ce même groupe de recherche, l'activité de ce complexe engendre un surenroulement de l'ADN qui permet le retrait de l'oligonucléotide contenant la lésion (Yu *et al*, 2004). L'activité de ce complexe

s'effectueraient donc suite à la détection du dommage et aux incisions 5' et 3' de la NER. Par contre, cette hypothèse n'explique pas le fait que le retrait de l'oligonucléotide peut s'effectuer normalement lors de la TC-NER en absence de Rad7/16-Abf1p (Gregory & Sweder, 2001).

De plus, ce complexe affecte localement la chromatine dans une région contenant des lésions en causant une augmentation de l'acétylation des queues des histones (Modèle proposé en figure 24). Cette acétylation serait dépendante d'une histone acétyltransférase, Gcn5p. Ce remodelage de la chromatine faciliterait le déplacement des nucléosomes afin que la machinerie de réparation puisse avoir accès à la lésion (Yu *et al*, 2011).

Malgré l'importance de ce complexe, deux de ces gènes furent initialement placés dans la classe 2, soit des gènes accessoires à la réaction de la NER. Cette décision était expliquée du fait que la réparation pouvait avoir lieu, *in vitro*, et que la sensibilité des levures aux rayons UV chez des souches *rad7Δ* et *rad16Δ* était modérée (Prakash & Prakash, 2000). Chez de telles souches, la GG-NER est déficiente.

Finalement, au niveau du locus de l'ADNr, principale région analysée dans cette thèse, il est important de mentionner les travaux effectués par le groupe du Dr. Brouwer. Suite à une délétion de *rad7Δ* ou *rad16Δ*, il y a toujours présence de réparation au niveau du brin non-transcrit de l'ADNr. Par contre, cette réparation est plus lente : elle n'est que d'environ 35% après une heure chez une souche *rad7Δ* ou *rad16Δ* par rapport à un peu plus de 60% chez une souche de type sauvage. À l'opposé, la réparation du brin transcrit n'est pas affectée de façon significative dans le laps de temps analysé (Verhage *et al*, 1996). Encore une fois, lors de ces analyses, les 2 populations d'ADNr n'ont pas été séparées, ce qui limite les conclusions sur l'effet du complexe Rad7/16-Abf1p sur l'ADNr. Ces derniers ont toutefois émis l'hypothèse que l'ADNr actif, où il y a absence de nucléosomes, pourrait être réparé normalement en absence de ce complexe (Verhage *et al*, 1996).

Toutefois, certains résultats présentés par le groupe de recherche du Dr. Fritz Thoma démontrent la nécessité du complexe Rad7/16-Abf1 afin de réparer certaines régions non-

nucléosomales très courtes (moins de 200 pb) : le promoteur et l'extrémité 3' du gène *URA3* et l'origine de réplication *ARS1* furent les régions analysées dans cette étude (Lettieri *et al*, 2008). Les auteurs de cette étude supposent qu'étant donné la présence de nucléosomes aux abords des régions analysées, le complexe Rad7/16-Abf1 serait toujours en mesure d'être impliqué. Conséquemment, l'impact de la délétion d'un des membres de ce complexe reste à définir au niveau de l'ADNr, puisqu'un gène ouvert présente un patron non-nucléosomal sur une longueur de 6,4 kb.

Ces hypothèses seront abordées, au niveau du chapitre 3 de cette thèse étant donné que notre laboratoire possède les techniques nécessaires pour séparer ces 2 populations d'ADNr afin de clarifier le rôle de ce complexe tant au niveau de l'ADNr fermé qu'ouvert.

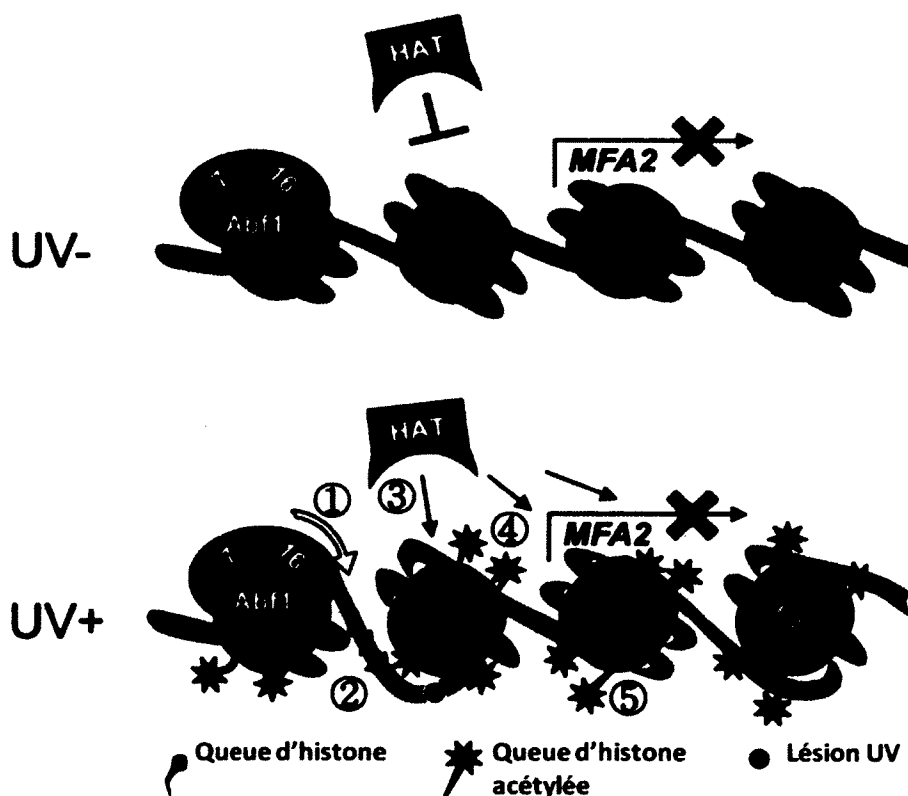


Figure 24 : Modèle suggéré expliquant le remodelage de la chromatine lors de la GG-NER par le complexe Rad7/16p. En absence de lésions causées par les rayons UV, de faibles niveaux d'histone acétyltransférase (HAT) sont détectés sur la chromatine du promoteur du gène *MFA2*. Conséquemment, les queues des histones ne sont pas acétylées et il n'y a pas de transcription. Suite à l'induction de lésions par les UV, les activités de translocation (1) et de E3 ligase (2) de Rad16p vont promouvoir le recrutement de HAT (3) et, donc, d'acétylation des histones (4). Ce remodelage engendrera une chromatine plus dynamique et ouverte (5) afin de permettre à la GG-NER d'avoir accès aux lésions. Image traduite et adaptée de (Yu *et al*, 2011).

1.5.3.4 Réparation couplée à la transcription (TC-NER)

La première étape du processus de la TC-NER s'initie lorsqu'une polymérase à ARN est bloquée à un site de lésion. Les pARN-II bloquées à un CPD sont très stables. De plus, elles inhibent l'accès au dommage. Par exemple, la photolyase n'est pas apte à avoir accès au dommage dans ce cas (Donahue *et al*, 1994). Le blocage de la pARN-II serait détecté par Rad26p qui permet le recrutement subséquent des autres protéines impliquées dans la NER, tel que défini dans la section précédente (Figure 24). Afin que la réparation puisse avoir lieu, la pARN-II se doit d'être retirée. Il existe plusieurs possibilités, soit A) qu'elle soit dégradée, de façon dépendante de Rad26p-Def1p (Somesh *et al*, 2005), B) qu'elle soit retirée du site de dommage par TTL, C) qu'elle soit retirée du site de dommage de façon dépendante de TTL Rad26p ou D) qu'elle recule afin de permettre l'accès à la lésion par la machinerie de réparation (Walmacq *et al*, 2012; Hanawalt & Spivak, 2008). Paradoxalement, la TC-NER des gènes transcrits par la polymérase à ARN II ne serait pas entièrement dépendante de Rad26p. En fait, il semble que les gènes faiblement transcrits nécessitent cette dernière, tandis que les gènes fortement transcrits nécessitent Rbp9p, une sous-unité accessoire de la pARN-II (Li & Smerdon, 2002). Par exemple, Rad26p est absolument requis au niveau de la réparation du gène *URA3*, partiellement requis pour le gène *RPB2* et n'est que faiblement requis pour la réparation du gène *GAL1*, lorsque ce dernier est en forte transcription (Li & Smerdon, 2002). Conséquemment, la délétion du gène *RAD26* n'inhibe pas totalement la TC-NER.

Au niveau des gènes de l'ARNr, transcrits par la pARN-I, il existe une TC-NER qui n'est pas dépendante de *RAD26* (Conconi *et al*, 2002; Verhage *et al*, 1996). De plus, à l'opposé des gènes transcrits par la pARN-II, la TC-NER des gènes ribosomaux ne semblerait pas nécessiter *RAD4*, mais plutôt *RAD34* (Den Dulk *et al*, 2005). Ces observations sous-entendent un processus de TC-NER bien différent au niveau des gènes de l'ARNr, probablement en raison de la structure particulière des gènes ribosomaux ouverts. Très peu d'informations sont disponibles quant aux étapes relatives à la détection de la polymérase à ARN I bloquée. Il a toutefois été démontré *in vitro*, qu'une pARN-I bloquée à un CPD protège 45 nucléotides contre une attaque par des exonucléases (Hara *et*

al, 1999). Cette information laisse sous-entendre que, tout comme les pARN-II, la pARN-I inhiberait l'accès au dommage à la machinerie de réparation.

1.5.3.5 L'impact de la chromatine sur la NER

Le fonctionnement de la NER dans les régions hétérochromatiques du génome reste encore peu exploré. Par exemple, l'insertion du gène *URA3* dans une région subtélomérique répressive à la transcription, de par l'action de *SIR2*, cause une faible NER par rapport à la même insertion dans une région subtélomérique permissive à la transcription (Irizar *et al*, 2010). Cet effet s'explique par le fait que Sir2p inhibe l'acétylation des histones causée par les rayons UV, puisque la souche *sir2Δ* ne présente plus de différences majeures au niveau des cinétiques de réparation des lésions (Irizar *et al*, 2010). Ces observations ne sont pas les seules à impliquer un effet de *SIR2* au niveau de la NER. Par exemple, les travaux de notre laboratoire ont démontré que sa délétion cause une augmentation de la récupération cellulaire suite à l'induction de dommages UV (Toussaint *et al*, 2006). Conséquemment, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'action de *SIR2* peut inhiber la réparation de par son action de déacétylation des histones. Une étude plus approfondie de l'impact de *SIR2*, et de sa potentielle action antagoniste au niveau de l'acétylation des histones nécessaire à la NER, au niveau de l'ADNr pourrait apporter des détails importants au rôle joué par la mobilité des nucléosomes suite à l'induction de dommages causés par les rayons UV. Ce sujet sera abordé dans le chapitre 3 de cette thèse.

1.5.3.6 Un mécanisme conservé de la levure à l'humain

Il est possible d'étudier la NER et de transférer les connaissances ainsi obtenues, chez la levure, au niveau de l'humain. Cela s'explique en grande partie par le fait que ce mécanisme de réparation est conservé et qu'il existe des homologues fonctionnels des gènes chez l'humain (Tableau 2) (Hoeijmakers, 2009). Par contre, l'une des exceptions notoires est celle qu'il n'existe qu'un seul membre de la famille XPC chez l'humain par

rapport à *S. cerevisiae*, qui en possède 2, soit *RAD4* et *RAD34* (Den Dulk *et al*, 2005). Cette différence explique en partie le fait qu'il n'existe pas de TC-NER des gènes ribosomaux chez l'humain.

Tableau 2: Comparaison des protéines impliquées dans la réparation par excision de nucléotides chez l'humain et *S. cerevisiae*. Tableau adapté de (Tremblay *et al*, 2009).

<i>S. Cerevisiae</i>	Fonction	Humain	Fonction
Rad1/10p	Endonucléase simple-brin, effectue la coupure 5' de la lésion	XPF-ERCC1	Endonucléase simple-brin, effectue la coupure 5' de la lésion
Rad2p	Endonucléase simple-brin, effectue la coupure 3' de la lésion	XPG	Endonucléase simple-brin, effectue la coupure 3' de la lésion
Rad3p	Sous-unité de TFIIH, hélicase 5'→3'	XPB	Sous-unité de TFIIH, hélicase 5'→3'
Rad4p	Liaison de l'ADN endommagée	XPC	Liaison de l'ADN endommagée
Rad14p	Liaison de l'ADN endommagée	XPA	Liaison de l'ADN endommagée
Rad7/16p- Abf1p	Liaison de l'ADN lésée de façon ATP dépendante, impliquée lors de GG-NER	DDB1/DDB2	Liaison de l'ADN lésée de façon ATP dépendante, impliquée lors de GG-NER
Rad23p	En complexe avec Rad4p, rôle régulateur de Rad4p	hR23B	En complexe avec XPC
Rad26p	Impliquée lors de la TC-NER des polymérases à ARN II	CSB	Impliquée lors de la TC-NER des polymérases à ARN II
Rad28p	Inconnue	CSA	Impliquée lors de la TC-NER des polymérases à ARN II
Rad33p	En complexe avec Rad4p et Rad23p	Centrin2	En complexe avec XPC et hR23B
Rad34p	Probablement impliqué lors de la TC-NER des gènes de l'ARNr. Structure similaire à Rad4p, en complexe avec Rad23p et Rad33p	Aucune identifiée	
Tfb1p	Sous-unité de TFIIH	p62	Sous-unité de TFIIH
Tfb2p	Sous-unité de TFIIH	p52	Sous-unité de TFIIH
Tfb4p	Sous-unité de TFIIH, interactions avec Ssl1p	p34	Sous-unité de TFIIH
Ssl1p	Sous-unité de TFIIH, interactions avec Tfb4p	p44	Sous-unité de TFIIH
Ssl2p (RAD25)	Sous-unité de TFIIH, hélicase 3'→5'	XPB	Sous-unité de TFIIH, hélicase 3'→5'
Met18p (MMS19)	Régulation de l'activité de TFIIH	hMMS19	Interactions avec XPD et XPB
RPA (Rfa1/2/3p)	Liaison de l'ADN simple-brin	RPA	Liaison de l'ADN simple-brin

1.6 Hypothèses et objectifs

L'intérêt de notre laboratoire se situant au niveau de la compréhension de l'impact des diverses structures de la chromatine sur la NER, nous avons décidé de nous intéresser à 3 grandes questions dans le cadre de ce travail qui, tout naturellement, mène à des sous-questions :

- 1) **Quel est l'impact réel des gènes *RAD4* et *RAD34* au niveau de la NER des gènes ribosomaux?** Tel que proposé par le Dr. Brouwer, le gène *RAD34* est-il impliqué au niveau de la TC-NER de la pARN-I? Quelle population d'ADNr est réparée par les protéines encodées par *RAD4* et *RAD34*? Ces questions seront abordées au premier chapitre.
- 2) **Qu'arrive-t-il à la polymérase à ARN I lorsqu'elle rencontre une lésion causée par les UVC?** Est-elle bloquée, tel qu'observé *in vitro*? Est-elle dégradée ou tombe-t-elle afin de laisser place à la machinerie de réparation? Ces questions seront abordées dans le second chapitre de ce travail.
- 3) **L'accessibilité aux lésions est-elle favorisée dans une structure de chromatine plus ouverte?** Une acétylation des queues des histones augmentée favorise-t-elle l'accessibilité aux dommages? Quel est l'effet du complexe Rad7/16-Abf1p sur l'ADNr? Le troisième chapitre abordera cette question.

Chapitre 1

Rôles complémentaires de *RAD4* et de *RAD34* dans la réparation par excision de nucléotides de l'ADN ribosomal actif et inactif chez *Saccharomyces cerevisiae*

Complementary roles of yeast Rad4p and Rad34p in nucleotide excision repair of active and inactive rRNA gene chromatin

Maxime Tremblay, Yumin Teng, Michel Paquette, Raymond Waters et Antonio Conconi.
Molecular and Cellular Biology, vol. 28, pages 7504-7513, 2008.

2.1. Avant-propos

Ma contribution pour cet article fut au niveau de la rédaction de la première version de ce manuscrit ainsi qu'à la révision des versions suivantes.

De plus, j'ai entièrement réalisé les expériences présentées au niveau des figures 1, 2, 3 et 5. De plus, les travaux de la figure 4, effectués par Y. Teng, furent réalisés avec de l'ADN que j'ai irradié et isolé avant de l'envoyer en Angleterre. Ma contribution totale, au niveau des expériences présentées et du temps nécessaire à les effectuer, se chiffre à plus de 90%.

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteur(s), co-auteur(s) de l'article intitulé :

Complementary roles of yeast Rad4p and Rad34p in nucleotide excision repair of active and inactive rRNA gene chromatin.

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire ☐ de la thèse ☒

de l'étudiant(e) (nom) : **Maxime Tremblay**

Inscrit(e) au programme de **Microbiologie**

de la Faculté de **Médecine et des Sciences de la Santé** de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature

Nom **Yumin Teng**

Date : **30 Apr. 2012**

Coordonnées **Department of Medical Genetics, Haematology and Pathology, School of
Medicine, Cancer Genetics Building, Cardiff University,
Heath Park, Cardiff, UK. CF24 4XN**

Signature

Nom **Michel Paquette**

Date : **17/05/2012**

Coordonnées **Département de médecine nucléaire et radiobiologie
FMSS Université de Sherbrooke
(819) 346-1110 1-1833**

Signature

Nom **Raymond Waters**

Date : **30th April 2012**

Coordonnées **Department of Medical Genetics, Haematology and Pathology, School of
Medicine, Cancer Genetics Building, Cardiff University,
Heath Park, Cardiff, UK. CF24 4XN**

Signature

Nom **Antoine Conconi**

Date : **17/05/12**

Coordonnées **Département de Microbiologie et Infectiologie
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke
PRAC - 3201, Rue Jean-Mignault, Québec, Canada. J1E 4K***

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

La réparation par excision de nucléotides (NER) retire une grande variété de lésions à l'ADN. Elle s'opère grâce à la participation de plusieurs complexes multi-protéiques afin d'identifier et de réparer l'ADN endommagé dans divers contextes de chromatine et de domaines nucléaires. Le nucléole est le domaine le plus transcriptionnellement actif et, chez la levure, la réparation couplée à la transcription s'effectue dans les gènes transcrits par la polymérase à ARN I (ADNr). Les travaux présentés dans cet article ont analysé le rôle de deux protéines, Rad4p et Rad34p, membres de la famille des protéines *Xeroderma pigmentosum* groupe C, pendant la NER dans les gènes actifs et inactifs de l'ADNr. Par des analyses de cinétique de réparation, il a été observé que Rad4p est essentiel pour la réparation de la région intergénique, de l'ADNr inactif ainsi qu'à la réparation du brin transcrit dans la région initiatrice de la transcription. À l'inverse, Rad34p n'est pas nécessaire dans ces régions, mais l'est au niveau de la réparation couplée à la transcription qui débute environ à 40 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription des gènes ribosomaux actifs. En somme, malgré que les protéines Rad4p et Rad34p partagent des homologies de séquences, leurs rôles dans le processus de la NER au niveau du locus de l'ADNr sont distincts et complémentaires. La somme des observations de ce travail fournit des preuves que la NER couplée à la transcription et que la réparation globale du génome participent de concert afin de retirer les lésions à l'ADN induites par les UV au niveau du brin transcrit de l'ADNr actif. De plus, l'ADNr non-nucléosomal est réparé plus rapidement que l'ADNr nucléosomal, ce qui implique qu'une forme ouverte de chromatine peut favoriser la réparation NER *in vivo*.

Veillez noter que des aspects supplémentaires n'ayant pas été mentionnés dans cet article seront abordés dans la discussion (section 5.1). Il est suggéré de lire cette partie de la discussion suite à la lecture de ce chapitre.

ABSTRACT

Nucleotide excision repair (NER) removes a plethora of DNA lesions. It is performed by a large multi-subunits protein complex that finds and repairs damaged DNA in different chromatin contexts and nuclear domains. The nucleolus is the most transcriptionally active domain and, in yeast, transcription-coupled NER occurs in RNA polymerase I-transcribed genes (rDNA). Here we have analyzed the role of two members of the *Xeroderma pigmentosum* group C family of proteins, Rad4p and Rad34p, during NER in the active and inactive rDNA. We report that Rad4p is essential for repair in the intergenic spacer, the inactive rDNA coding region and for strand specific repair at the transcription initiation site, whereas Rad34p is not. Rad34p is necessary for transcription-coupled NER that starts about 40 nucleotides downstream of the transcription initiation site of the active rDNA, whereas Rad4p is not. Thus, although Rad4p and Rad34p share sequence homology, their roles in NER in the rDNA locus are almost entirely distinct and complementary. These results provide evidences that transcription-coupled NER and global genome NER participate in removal of UV-induced DNA lesions from the transcribed strand of active rDNA. Furthermore, non-nucleosome rDNA is repaired faster than nucleosome rDNA, indicating that open chromatin structure facilitates NER *in vivo*.

INTRODUCTION

Nucleotide excision repair (NER) removes lesions from DNA such as the UV photoproducts *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) and pyrimidine (6-4) pyrimidone. The NER pathway involves damage recognition, incision of the DNA strand containing the damage, excision of the lesion and repair synthesis (16, 43). In addition, CPDs are rapidly eliminated from the transcribed strand (TS) of active RNA polymerase II (RNAPII) -transcribed genes, a process that is referred to as transcription-coupled NER (TC-NER) (3, 29, 34, 35, 45). In yeast, mutations in the *RAD26* gene affect TC-NER (55) but not repair of the non-transcribed regions of the genome, or global genome NER (GG-NER). The GG-NER requires the Rad7p-Rad16p and Abf1 complex (16, 43).

Much research has been devoted to elucidate the roles of Rad4p. For instance, it was found that deletion of *RAD4* causes the DNA incision step to be completely defective, that Rad4p is required for NER *in vitro*, and that binding of Rad4p (and Rad2p) to TFIIH defines intermediates during the assembly of NER proteins at sites of DNA damage (2, 22, 43, 63). Therefore, it is suggested that the Rad14p/Rad4p-Rad23p complex locates the DNA lesions and promotes assembly of the repair machinery at these sites (21, 22, 23, 28). During this process, Rad4p first binds undamaged DNA sequences, then it repositions at the 3' side of the lesion and induces flip out of the damaged base from the DNA helix (38, 48). The Rad4 protein works in complex with Rad23p, which has an ubiquitin-like domain and supports interactions with the 19S regulatory particle of the 26S proteasome. The ubiquitin proteasome pathway plays important roles in NER via both proteolytic and non-proteolytic activities (19, 44, 65). The *Xeroderma pigmentosum* group C (XPC) gene is the human counterpart of *RAD4*. However, whereas Rad4p is required for the incision step in both GG-NER and TC-NER, the XPC protein is only required for GG-NER (57, 58). This led to the hypothesis that XPC makes compact chromatin accessible to NER. To investigate for this possibility, the activity of XPC was analyzed on nucleosome DNA. In one study it was observed that addition of undamaged naked DNA to *in vitro* NER reactions hampers XPC binding to photoproducts. Conversely, no inhibitory effect occurs when the

undamaged carrier DNA is wrapped into nucleosomes, suggesting that the presence of nucleosomes in undamaged DNA endorses the specificity of XPC for damaged sites (49). Another study showed that binding of XPC to DNA lesions is hindered when these are positioned within nucleosome DNA (25). Finally, a recent report has shown that Rad4p-Rad23p co-purifies with two subunits of the SWI/SNF chromatin-remodeling complex. Since UV stimulates this interaction, it is proposed that Rad4-Rad23p recruits the SWI/SNF chromatin-remodeling complex to DNA lesions, which enhances accessibility for NER to nucleosome DNA (20). In summary, the Rad4p/XPC-group of proteins appears to have multiple functions, which could be affected by factors like: transcription rate, chromatin structure, and the sub-regions of the nucleus that undergo repair. Moreover, while Rad4p is considered indispensable to repair UV-damaged DNA (43), a series of *in vitro* assays have shown that repair of DNA lesions in locally unwound DNA can take place in the absence of XPC (40).

The *nucleolus* is a defined region that is made of clusters of ribosomal genes (rDNA or rRNA genes). The rRNA genes are heavily transcribed by RNA polymerase I (RNAPI) (39), and are present in multiple copies [~ 150 in yeast; 42] of two coexisting and distinct types, forming *total* rDNA. One type is permissive to transcription and the other is transcriptionally refractive (11, 12, 13, 24). Canonical nucleosomes are absent from the coding regions of ribosomal genes that are permissive to transcription (open rDNA), whereas nucleosomes are present on the inactive genes (closed rDNA) (30, 47). Also, nucleosomes are found on most of the DNA sequences flanking the rDNA units (or intergenic spacers) (30, 47, 61). In contrast to human cells, yeast rapidly remove CPDs from rDNA (7, 8). Furthermore, strand-specific repair was observed in rDNA of *rad7 Δ* and *rad16 Δ* mutants (59) and TC-NER was measured in the active rDNA fraction of wild type (WT) cells (7, 10, 33). Although NER was analyzed in *total* rDNA and important results were reported (14, 15, 59), a number of questions remain unanswered because those studies did not follow NER separately in the active and inactive rDNA. Namely, in *rad4 Δ* about half of all CPDs in the TS of *total* rDNA are repaired, whereas no repair occurs in the rest of the genome, including the non-transcribed strand (NTS) of *total* rDNA (59). In spite of the fact that this observation was not explained, the role of Rad4p in the repair of RNAPI

transcribed rDNA is more akin to the role of Rad7/Rad16 in the repair of RNAPII transcribed genes, and to the role of XPC in the repair of RNAPII transcribed genes in human cells. Also, YDR314C (renamed Rad34p) shares sequence homology with Rad4p (31). It interacts with Rad23p (18) and is involved in repair of rDNA, but it does not participate in NER of RNAPII transcribed genes (14). The function of Rad34p was investigated using *rad16Δ* as a background strain, and NER was measured in a *rad16Δ* vs. a *rad16Δ/rad34Δ* double mutant (14). It was found that in the double mutant there is no preferential repair of the rDNA transcribed strand, suggesting that Rad34p could be involved in TC-NER. However, as stated by the authors (14), those experiments have not shown that such Rad34p-dependent preferential repair occurs only in the active rDNA. Consequently, the possibility that the Rad34-dependent repair in *rad16Δ* cells is in fact RNAPI transcription independent could not be excluded. Hence, the participation of Rad34p in TC-NER of rDNA was not definitively shown (14).

Psoralen crosslinking has been employed to separate the two forms of rDNA, and to study the structure of chromatin during transcription, replication and repair (47, 53). In this report, psoralen crosslinking was used to verify that active rDNA is preferentially released when nuclei are digested with restriction enzymes. Thereafter, active and inactive rDNA were separated, and NER was followed in both rDNA populations of WT, *rad4Δ*, *rad34Δ* and *rad4Δ34Δ* cells. The rates of NER in the active and inactive rDNA chromatin of the coding regions were measured against the rates of NER in the mostly non-transcribed intergenic spacers, which are organized in nucleosomes. In addition, CPD removal was analyzed at the nucleotide level in the promoter region and around the RNAPI transcription initiation site. These experiments were undertaken to identify the boundaries between regions where Rad4p and Rad34p promote repair, to determine whether they have complementary or redundant functions and to compare TC-NER with RNAPI transcription elongation.

MATERIAL AND METHODS

Yeast cells and UV irradiation.

S. cerevisiae, [strain JS311 (*RAD*⁺) (46)] was grown in YEPD to early log-phase ($OD_{600} = 0.4$; $\sim 1.2 \times 10^7$ cells/ml). The isogenic *rad4* Δ , *rad34* Δ and *rad4/34* Δ strains were constructed by PCR-mediated gene disruption as previously described (1). Cultures were harvested by centrifugation, washed in ice cold PBS (137 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0) and resuspended in the same buffer to 2×10^7 cells/ml. Cell suspensions were poured into trays to a ~ 2 mm depth and irradiated (primary 254 nm) with 180 J/m^2 of UV (UVX radiometer; Ultra-Violet Products, Upland, USA). Then, cells were harvested, resuspended in YEPD and incubated in the dark at 30°C with continuous shaking for the indicated repair times (see Results).

Nuclei isolation and DNA extraction.

Cells ($\sim 1.6 \times 10^9$ cells) were collected, washed with ice cold PBS, resuspended in 1.5 ml of ice cold nuclei isolation buffer (NIB: 50 mM MOPS, pH 8.0, 150 mM potassium acetate, 2 mM $MgCl_2$, 17% glycerol, 0.5 mM spermine and 0.15 mM spermidine) and transferred to 15 ml polypropylene tubes containing 1.5 ml of glass beads (425-600 μm , Sigma). Cells were disrupted by vortexing: 16 x 30 sec pulses with 30 sec pauses on ice. Nuclear suspensions were collected and the glass beads rinsed twice with 1 ml of NIB. The combined suspensions were centrifuged as previously described (7, 10). Nuclei were resuspended in 800 μl NIB and stored in 200 μl aliquots at -80°C in the dark.

To measure repair of the individual strands of active and inactive rDNA, nuclei were pelleted, resuspended in 0.5 ml of *Eco*RI restriction enzyme buffer and digested according to the manufacturer (New England BioLabs). DNA from *Eco*RI-digested nuclei was extracted as described below, resuspended in *Nhe*I buffer and digested according to the

manufacturer (New England BioLabs). All steps were carried out under gold light (Reprographic gold; Standard Products Inc.). In parallel, aliquots of *EcoRI*-digested nuclei were photo-crosslinked with psoralen to monitor the separation of active from inactive rDNA, as previously described (7, 10).

To measure NER in *total* rDNA, DNA was extracted from cells broken by vortexing in the presence of glass beads, as described above. To each 200 μ l-aliquot was added: 300 μ l TE buffer, 225 μ l 3M Na-acetate and 35 μ l 10% SDS. After two extractions with phenol:chloroform (1:1) and one extraction with chloroform, nucleic acids were precipitated in isopropanol. Following centrifugation, pellets were dissolved in TE buffer, treated with RNase (Roche), phenol extracted and precipitated in ethanol. DNA was resuspended in TE and digested with the appropriate restriction enzymes as described in Results.

T4 endonuclease digestion, alkaline gel electrophoresis, Southern blotting and quantification of CPD yield.

DNA samples were cleaved at CPDs by T4 endonuclease V (T4 endo V; Epicentre) according to manufacturer's recommendations. After T4 endo V digestion, ~ 5 μ g of DNA per sample were separated by 1% alkaline agarose gel electrophoresis (7, 10). DNA was transferred to Hybond-XL membranes (GE Healthcare) in 0.4 N NaOH. Radioactive probes (Figure 1A; upper panel) were generated using random primers or strand-specific riboprobes kits (Promega), and hybridization and washing done at 65 °C as previously described (11). Filter membranes were exposed to phosphorimager screens (Molecular Dynamics) and CPDs quantified from phosphorimages of the Southern blots using ImageQuant software (Molecular Dynamics). Measurement of CPDs in each strand of rDNA was performed as previously described (7, 10).

High resolution mapping of the CPD sites.

Measuring CPDs in the individual strands at nucleotide resolution was carried out as previously described (50). DNA was digested with *HhaI* at 37°C for 1 h in a total reaction volume of 200 µl generating a 768 bp fragment covering upstream (266 bp) and part of the coding region (502 bp) of the 35S rRNA gene (Figure 1A; upper panel). After phenol:chloroform extraction, DNA was precipitated using 20 µl of NaAc (3 M) and 220 µl of isopropanol. Then, DNA pellets were resuspended in 100 µl of TE buffer and cleaved specifically at CPDs using T4 endo V as above. After phenol:chloroform and chloroform extraction, to detect damage in the TS, 1 pmol of biotinylated probe-1 (5'-biotin-GATAGCTTTT TTCGCGTTTCCGTATTTTCCGCTTGG) was added to the samples. The DNA were denatured at 95°C for 5 min and then incubated at 55°C for 15 min, to allow probe annealing to rDNA fragments. [The length of the fragments annealed to the probe depends on the position of CPDs within the fragment]. Next, 100 µg of washed Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) were added to samples, mixed and kept at room temperature (RT) for 15 min, to allow binding of the streptavidin-coated Dynabeads to the biotin molecule at the 5'-end of the probe. The rDNA fragments were purified with the Dynal magnetic particle concentrator. The supernatant containing the NTS fragments (and the rest of the genomic DNA) was removed and kept for purification of the NTS. The NTS of rDNA fragments were purified as for the TS, except that probe-2 used was (5' biotin-GAT AGC TTT TTT CFC ACT CCG TCA CCA TAC CAT AGC A). The beads were washed with 50 µl of washing buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1.0 M NaCl) at 55°C for 5 min and then the buffer removed. Two more washes were done with 50 µl of H₂O at RT. Then, rDNA fragments were end-labelled with six [α -³²P]dATP residues by T7 DNA polymerase (Amersham) that uses the six-T overhang of the probes as template (as per 50). The reaction was complete after 10 min at 37°C and the Dynabeads washed twice with 30 µl of TE. Finally, the labeled rDNA fragments were eluted from the Dynabeads at RT by addition of 3 µl of formamide loading buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue), and separated by length by 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The running buffer was TBE (89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2.5 mM Na₂EDTA•2H₂O) and electrophoresis was carried out at 40 V/cm.

Gels were exposed to phosphorimager screens, CPD quantification in rDNA was performed from phosphorimages using ImageQuant software as described (52).

RESULTS

Removal of CPDs from the coding regions of *total* rDNA is considerably reduced in *rad4Δ* cells.

We first examined NER of *total* rDNA. At different times after irradiation, DNA was isolated from WT and *rad4Δ*, digested with *Eco*RI and treated with T4 endo V. Thereafter, DNA repair was measured by denaturing gel electrophoresis and Southern blotting as described in (3). Typical images are shown in Figure 1B (upper panel), where bands correspond to the ~ 2.9 kb fragment that is released from the central portion of the rDNA transcription unit (Figure 1A; E₄-E₅). After incubation with T4 endo V, changes in signals intensities of the *Eco*RI bands (compare - with + lanes) reflect the number of strand breaks at CPDs. The data show that in WT both TS and NTS are repaired, whereas in *rad4Δ* repair occurs only in the TS (compare lanes 5-12 with lanes 3 and 4). Quantitative analyses (lower panel) indicate that in WT ~ 80% of CPDs are removed from both DNA strands during 4 h repair (triangles; filled and empty symbols). For *rad4Δ*, ~ 60% of CPDs are repaired from the TS (filled circles), whereas no repair is observed in the NTS (empty circles). Thus, the time courses for CPDs removal measured in the yeast strains used in this study can be directly compared against those of (59).

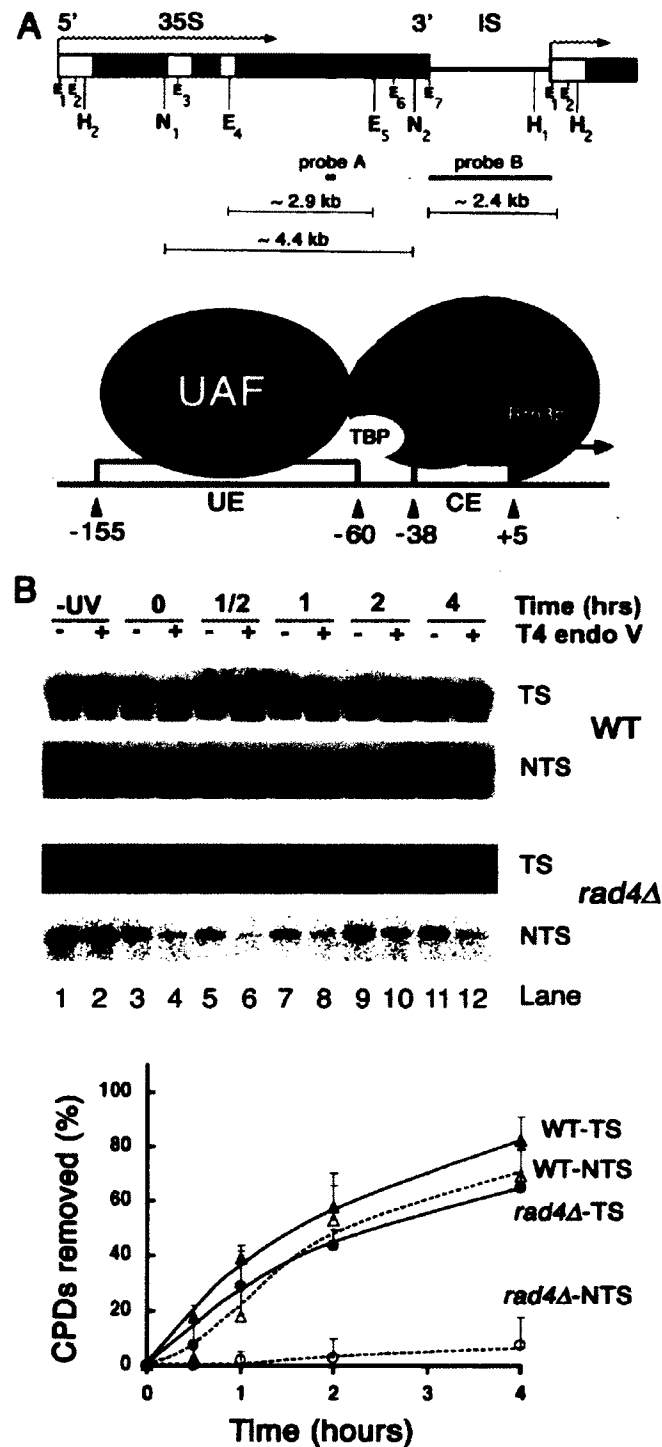


Figure 1. (A) Upper panel: map of the yeast 35S rRNA gene. The gene, its 5'- and 3'-ends and direction of transcription (wavy arrow) are shown. Black boxes represent the probes (A: ~140 bp and B: ~2.4 kb). E₁₋₇ mark the positions of the seven *Eco*RI restriction sites, N₁₋₂ the positions for the two *Nhe*I restriction sites and the H₁₋₂ the positions for the two *Hha*I sites used in this study (Note; in the rDNA locus there are 16 *Hha*I sites). IS: intergenic spacer. Lower panel: in yeast, transcription initiation entails the interaction of at least 4 transcription factors with the promoter elements UE (upstream element) and CE (core element). UAF (upstream activating factor), CF (core factor), TBP (TATA-box binding protein), Rm3p binds RNAPI. DNase I footprinting was shown for UAF (nucleotides -160 to -50) and CF (nucleotides -45 to +1) (4, 61).

The arrow shows the direction of transcription and +1 is the site of transcription initiation (adapted from 39, 42). (B) Repair of CPDs in the coding region of *total* rDNA, in WT and *rad4Δ*. Cells were irradiated with 180 J/m² and harvested at the times indicated (in hours). Total DNA was purified, digested with *Eco*RI, treated with T4 endo V and separated on 1% alkaline agarose gels. After blotting filters were hybridized with strand-specific riboprobes-A (Figure 1A). Upper panel: representative phosphorimage for the transcribed (TS) and the non-transcribed (NTS) strands of WT and *rad4Δ*. Lower panel: quantification of the phosphorimages. DNA repair is expressed as percent of CPDs removed vs. repair time (in hours). Triangles denote WT and circles denote *rad4Δ*. Filled symbols (solid lines) and empty symbols (dashed lines) represent data for the TS and the NTS, respectively. Data are the mean of 3 independent experiments.

In the absence of Rad4p, repair of the individual DNA strands from active- and inactive-rDNA are unevenly affected.

Determining the efficiency of strand specific repair in *total* rDNA by the Southern blot assay (as described above) is incomplete because data represent an average of active and inactive rDNA copies. Accurate measurements are obtained when the two forms are separated and repair is followed individually for the active and inactive rDNA population. To do so, nuclei were isolated from yeast harvested at the specified repair times, and then digested with *Eco*RI (Figure 1A; upper panel). Restriction enzyme digestions of nuclei release only active rDNA because nucleosomes are absent from these genes, making them accessible to endonucleases (e.g. 7, 10, 41). Thereafter, DNA was purified and re-digested with *Nhe*I (Figure 1A; upper panel). Because the two *Eco*RI sites are within the *Nhe*I sites, a full-length fragment (~ 4.4 kb) obtained after *Nhe*I digestion of DNA isolated from *Eco*RI-treated nuclei contains primarily inactive rDNA. This double digestion allows following DNA repair in the inactive rDNA (*Nhe*I; i- band) and in the active rDNA (*Eco*RI; a- band) on the same filter membrane, as previously described (7, 10). Psoralen photocrosslinking was used to monitor the separation of the two rDNA-populations (data not shown, but see 7, 10).

In WT and *rad4Δ*, at 180 J/m² the average yield of CPDs / kb in the TS was 0.37 ± 0.04 and in the NTS was 0.32 ± 0.05 . Representative data showing T4 endo V analyses for the TS and NTS of active ('a') and inactive ('i') rDNA are presented in Figures 2A and 2B. The percent CPDs removed are given in Figure 2E (WT and *rad4Δ*). For the WT, repair is significantly faster in the TS of active rDNA than in the NTS of the same fraction (WT;

TS-a and NTS-a, compare solid and open circles). During the first 2 hours over twice as many CPDs are removed from the TS compared to the NTS. The process of TC-NER does not occur in the inactive rDNA and there is no difference in repair rate between the TS and NTS (WT; TS-i and NTS-i, compare solid and open triangles). Furthermore, CPDs are removed faster from the active rDNA than from the inactive rDNA chromatin. Also, the repair rate of active rDNA chromatin is initially fast but rapidly levels off during removal of the remaining ~ 20% of CPDs. Conversely, removal of CPD from inactive rDNA chromatin occurs at a more uniform and slow rate throughout the entire repair time. For *rad4Δ*, DNA repair in the TS of active rDNA (TS-a) is very rapid, complete within two hours and faster than in WT. On the contrary, DNA repair in the NTS of active rDNA is drastically reduced; only ~ 20% of the total CPDs are removed (*rad4Δ*; NTS-a, open circle). Finally, very little or no repair was measured in the TS and NTS of inactive rDNA, (*rad4Δ*; TS-i and NTS-i, triangles).

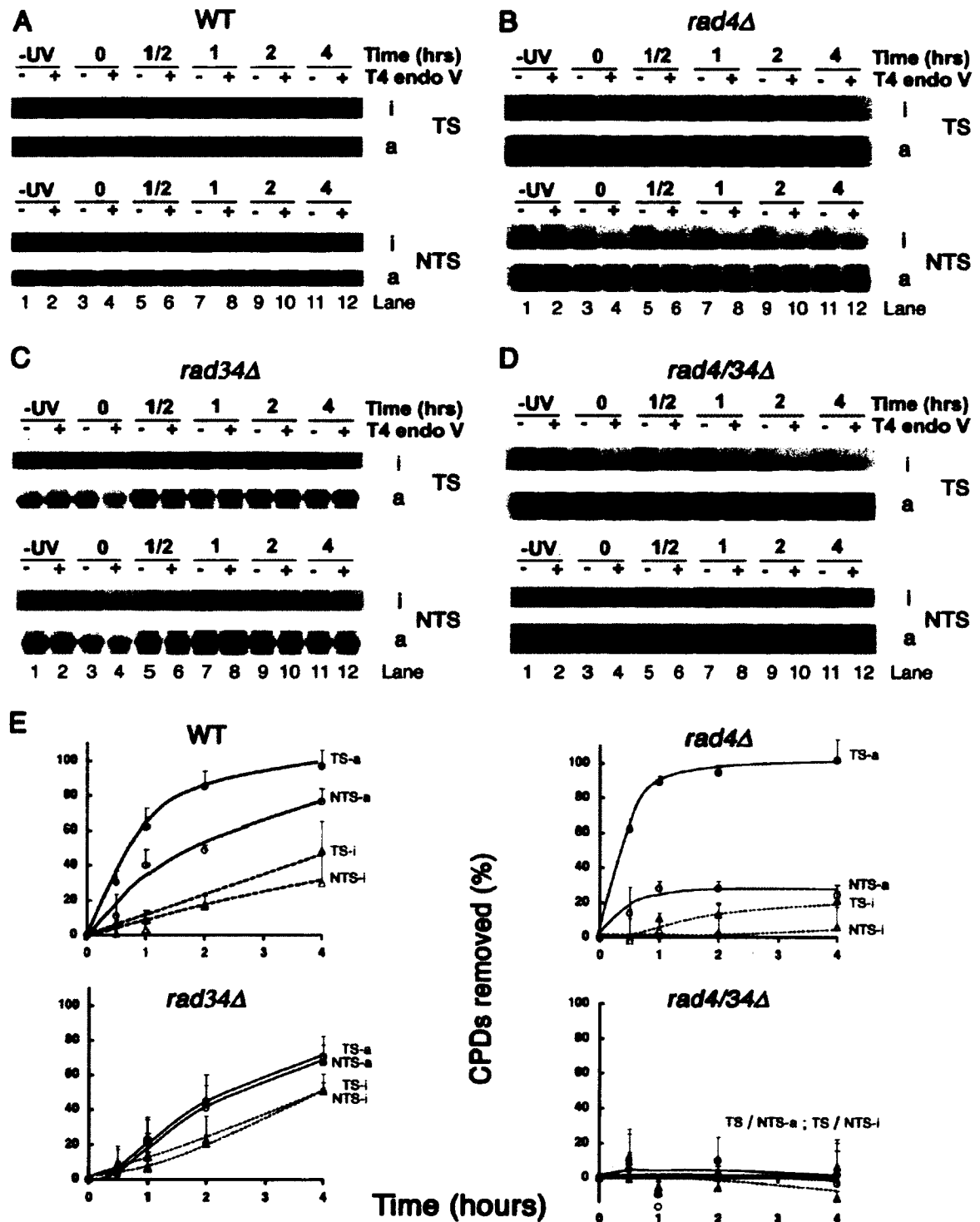


Figure 2. Repair of individual DNA strands in the coding regions of active and inactive rDNA. Nuclei were isolated from unirradiated cells (-UV; lanes 1 and 2) and from cells that were irradiated at 180 J/m² (lanes 3 to 12). (A) WT-, (B) *rad4Δ*-, (C) *rad34Δ*- and (D) *rad4/34Δ*- cells were harvested at the times indicated (in hours). Nuclei were digested with *EcoRI*, their DNA isolated and redigested with *NheI*. DNA samples, mock-treated or treated with T4 endo V (denoted by - and +, respectively) were separated on a 1% alkaline agarose gel, blotted and hybridized with strand-specific riboprobes-A (see Figure 1A). Upper panels: transcribed strands (TS) and lower panels: non-transcribed strands (NTS). To conserve space the central portion of each gel, separating the inactive rDNA ('i') from the active rDNA ('a') is not shown (examples of complete gels

can be seen in 10). (E) Quantification of phosphorimages. Data are from active rDNA (circles) and inactive rDNA (triangles). Solid and open symbols represent data from the TS and NTS, respectively. Data are the mean \pm 1 SD of 4 independent experiments.

Lack of Rad34p affects repair in the transcribed strand of active, non-nucleosomal rDNA.

To gain further insights into NER in RNAPII transcribed genes, nuclei were isolated from *rad34Δ* and *rad4/34Δ*, before and after UV. Nuclei were incubated with *EcoRI*, the purified DNA was re-digested with *NheI* and processed as described above. In *rad34Δ* and *rad4/34Δ* the yields of CPDs for the active and inactive rDNA fractions, TS and NTS, were as in WT (see above). Representative images of these experiments, showing repair analyses for the TS and NTS of active ('a') and inactive ('i') rDNA, are shown in Figures 2C and 2D. The data, expressed as percent CPDs removed over time are in Figure 2E (*rad34Δ* and *rad4/34Δ*).

For *rad34Δ*, repair in the TS of active rDNA is reduced to the rate measured in the NTS (Figure 2E, compare WT and *rad34Δ*; TS-a and NTS-a, solid and open circles). Therefore, TC-NER is abolished in *rad34Δ* (*rad34Δ*; compare TS-a and NTS-a). Contrarily, DNA repair in the NTS of active rDNA is only slightly affected: on average ~ 15% less efficient than in WT. Finally, repair of the inactive rDNA chromatin is unaffected in *rad34Δ* (Figure 2E, compare WT and *rad34Δ*; TS-i and NTS-i, solid and open triangles), is uniform and proceeds at a slow rate. For *rad4Δ/rad34Δ* repair is entirely abolished in both DNA strands and rDNA fractions (Figure 2E, *rad4Δ/rad34Δ*).

Repair of the nucleosomal intergenic spacers between rDNA units is affected in *rad4Δ* but not in *rad34Δ* cells.

In the absence of Rad4p, inactive DNA and both strands of RNAPII transcribed genes are not repaired (59, 60). On the other hand, CPDs are rapidly removed from the TS of active rDNA (see above). To determine whether the redundancy of Rad4p is unique to DNA sequences that are loaded with RNAPII, DNA repair was followed in the intergenic

spacers between rDNA units (IS; Figure 1A, upper panel). WT and *rad4Δ* cells were irradiated and incubated for different repair times, the DNA was isolated, digested with *EcoRI* and prepared for the T4 endo V assay as described in Methods. Representative Southern blots are shown in Figure 3A (WT and *rad4Δ*), where the *EcoRI*-band represents almost and only the entire IS region (Figure 1A; E₇-E₁). The changes in signal intensities of the *EcoRI* bands (lanes 5 to 12; compare - and + T4 endo V) indicate that repair occurs in WT but not in *rad4Δ*. Quantitative analyses of the data reveal that in WT ~ 60% of the CPDs are removed after 4 hours, and that NER occurs at a uniform and slow rate (Figure 3B; WT, solid circles). Very little or no repair was measured in the IS of *rad4Δ* (Figure 3B; *rad4Δ*). Similar experiments were carried out with *rad34Δ* and *rad4Δ/rad34Δ*. The changes in signal intensities of the *EcoRI* bands (Figure 3A, *rad34Δ*; compare - and + T4 endo V in lanes 5 to 12) indicate that repair occurs in *rad34Δ* but not in the double mutant (Figure 3A, *rad4Δ/rad34Δ*). Quantitative analyses show that in *rad34Δ* ~ 60% of the CPDs are removed after 4 hours and, similar to WT, at a uniform and slow rate (Figure 3B, *rad34Δ*). Again, very little or no repair was measured in the IS of *rad4Δ/rad34Δ* (Figure 3B; *rad4Δ/rad34Δ*).

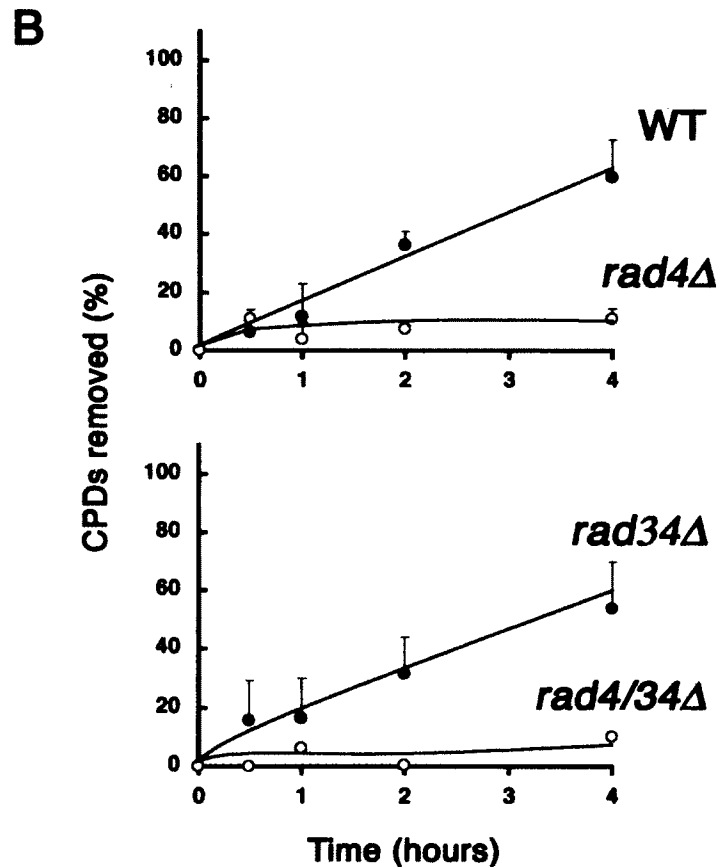
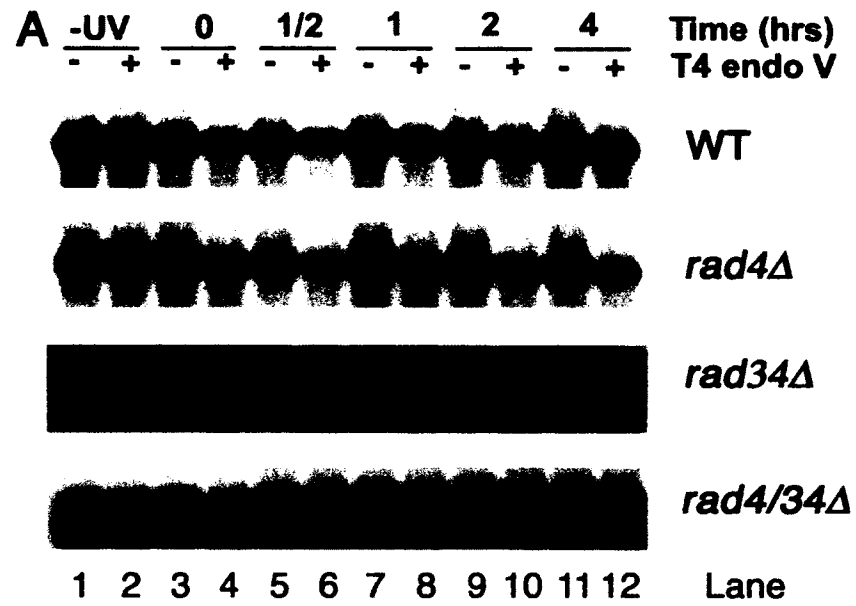


Figure 3. Repair of CPDs in the intergenic spacer (IS). Cells were irradiated and their DNA prepared as described in Figure 1B. After DNA separation on 1% alkaline agarose gel electrophoresis and blotting, filters were hybridized with random primer-labeled probe-B (Figure 1A). (A) Representative phosphorimages for WT, *rad4Δ*, *rad34Δ* and *rad4/34Δ*. (B) Quantification of phosphorimages. Data are the mean \pm 1 SD of 3 independent experiments for WT, *rad4Δ* and *rad34Δ*. For the *rad4/34Δ*, data are the mean of 2 independent experiments.

Rad4p independent TC-NER starts 40 bases downstream of the transcription initiation site, and is faster than in WT.

To examine the role of Rad4p in more detail we analyzed repair at nucleotide resolution (50). This enables to define where Rad4p is determinant for NER, around the promoter and the first ~ 400 bases of the coding region. Figure 4 depicts typical phosphorimages of gels showing CPD repair in the TS (Figure 4A) and NTS (Figure 4B) of rDNA in WT, *rad4Δ* and *rad34Δ* strains. The top band of each gel represents the whole *Hha*I restriction fragment (768bp) (Figure 1A; H₁-H₂) free of CPDs, while each band below indicates the presence of a CPD at a single nucleotide position. The intensity of the bands reflects the frequency of lesions either at individual sites or in polypyrimidine tracts. A strong band indicates high frequency of CPDs and fast disappearance of a band after repair time indicates fast repair. The quantified data are reported in Figure 4C, where the time for removing 50% of the initial CPDs at each site (T_{50%}) is plotted over ~ 500 bp of rDNA. Data points correspond either to a single CPD between adjacent pyrimidines or to clusters of CPDs that are formed at close proximity.

In the rDNA promoter of WT, repair for the TS is generally slow and, upstream of position -20, the T_{50%} for most of the CPDs is over 5 hours. A group of CPDs around position -10 is repaired faster with a T_{50%} of ~ 3 hours. Inside the coding region, from position +5 to +34, repair slows down with a T_{50%} of 3~6 hours. The next cluster of CPDs, downstream of position +40, is repaired rapidly with a T_{50%} of less than 1 hour. Fast repair occurs throughout the rest of the coding region examined, with T_{50%} measurements ranging from 0.5 to 2.5 hours. Conversely, repair in the NTS is generally slow, with T_{50%} measurements of over 3.5 hours for all CPDs. This shows that strand specific repair occurs in the promoter region, and that TC-NER starts downstream of position +40. Analysis of the *rad4Δ* mutant show that there is no repair in both DNA strands of the promoter and of the first 40 nucleotides in the coding region. However, from position +40, and downstream, repair of CPDs in the TS is faster than in WT (T_{50%} of ~ 0.5 hours for most sites), corroborating the data shown in Figure 2E (*rad4Δ*). These results indicate that strand

specific repair between -10 and +34 requires Rad4p and that TC-NER from +40 onwards occurs in the absence of Rad4p.

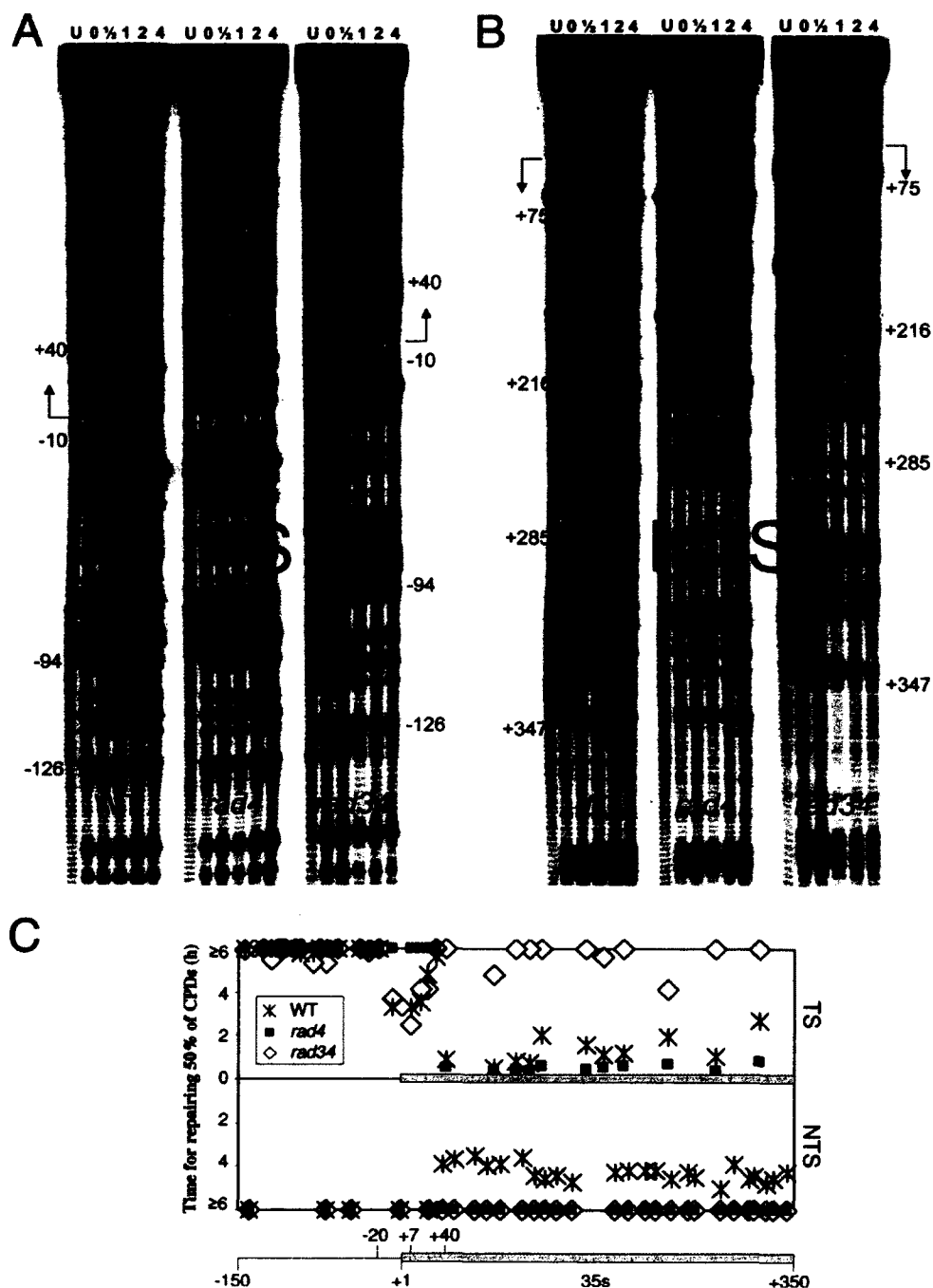


Figure 4. Repair of CPDs in rDNA at nucleotide resolution. (A) Typical sequencing gels depicting repair of CPDs in the TS of the *HhaI* restriction fragment in WT, *rad4*Δ and *rad34*Δ. U: DNA extracted from non-irradiated cells; 0: DNA extracted from cells immediately after UV (180 J/m²) or after 0.5, 1, 2 and 4 h of

repair. The arrow indicates direction of transcription and the initiation site. The numbers refer to the nucleotide positions related to the transcription initiation site (+1). **(B)** Typical sequencing gels depicting repair of CPDs in the NTS of *HhaI* restriction fragment in WT, *rad4Δ* and *rad34Δ*. Figure legend is as in (A). **(C)** Repair is presented as the time (h) needed to remove 50% of CPDs ($T_{50\%}$) at a given site in the *HhaI* fragment for WT, *rad4Δ* and *rad34Δ*. Quantification of gels as in (A) and (B) enabled calculation of $T_{50\%}$ of single or clustered CPDs with similar repair rates, as described in (50). $T_{50\%}$ of slowly repaired CPDs and of non-repaired CPDs ($T_{50\%} \geq 6$ h) are shown at the same level (6 h). The map represents the ~500 bp *HhaI* fragments comprising the rDNA promoter and the first ~350 bp of the coding region. The numbers indicate the nucleotide positions related to the transcription initiation site (+1).

Rad34p is required for Rad4p-independent TCR of rDNA.

In the *rad34Δ* mutant, repair of CPDs in the TS and upstream of position -20 is slow. Like the repair measured in WT, the $T_{50\%}$ in this region of the rDNA promoter is over 5 hours. Also, similar to WT, are the repair rates in the TS between positions -10 and +34. Thus, strand specific repair around the transcription initiation site requires Rad4p but is independent of Rad34p. Downstream of position +40, repair in *rad34Δ* is considerably slower (most of $T_{50\%}$ are of 6 hours) than in WT and *rad4Δ* ($T_{50\%}$ of less than 1 hour). These analyses of repair at the nucleotide level complement the data presented in Figure 2, and show that Rad34p is necessary for TC-NER that starts around nucleotide +40. Repair of the NTS in the *rad34Δ* strain is homogenously slower than in the WT. We note that some CPDs are repaired in *rad34Δ* as measure by the T4-endoV/Southern assay. This is not necessarily found by the high-resolution analyses, as the plot shows $T_{50\%}$ of CPDs, irrespective of the amount of damage induced at any given CPD site. Moreover, high resolution mapping of CPD removal was analyzed for each single nucleotide (or small groups of polypyrimidine tracts) in the first 502 bp of the rDNA-coding region. In contrast, repair measured by the T4-endoV/Southern blot assay (Figure 2E) reflects the average repair of all CPDs within the large central portion of the rDNA-coding region (either 2.9 or 4.4 kb).

DISCUSSION

The separation of active and inactive rDNA populations, together with the repair data measured at the nucleotide level, have provided novel information on the roles of the Rad4 and Rad34 proteins. It was previously shown that in *rad4Δ* cells ~ 60% of CPDs are removed from the TS of *total* rDNA, whereas little or no repair occurs in the rest of the genome, including the non-transcribed strand (NTS) of *total* rDNA. These results were not fully explained since the assays used could not discriminate between active and inactive rDNA (59). We re-examined repair in *total* rDNA (Figure 1B) and, in parallel, monitored repair in the active and inactive rDNA fractions (Figure 2). Our results show that ~ 60% of CPDs removed from the TS of *total* rDNA correspond to the average of repair measured in the TS of active rDNA (100% CPDs removed) and in the TS of inactive rDNA (less than 15% CPDs removed). Therefore, in *rad4Δ* the TS of active rDNA is fully repaired and almost no repair occurs in the TS of inactive rDNA. Interestingly, the TS of active rDNA is repaired faster in *rad4Δ* than in WT (Figures 2E and 4C). Since in *rad4Δ* cells NER is inoperative for most of the genome, very fast repair of the TS of active rDNA could reflect the extra availability of NER factors to repair rDNA. Also, the results in Figure 2 show that both TC-NER and GG-NER participate in removal of CPDs from the TS of active rDNA. In fact, in absence of Rad34p TC-NER is abolished, only GG-NER is operative, and the two strands of active rDNA are equally and slow repaired. On the other hand, in *rad4Δ* cells GG-NER is abolished and TC-NER is the only pathway that repairs the TS of active rDNA, which could explain the very fast removal of CPDs from the TS. Yet, GG-NER is the main pathway that repairs the NTS of active rDNA and both DNA strands of inactive rDNA, and is largely unaffected in *rad34Δ* cells. As expected, no repair occurs when both pathways are abolished (*rad4/34Δ*). Alternatively, very fast repair of the TS of active rDNA in *rad4Δ* could be explained by Rad23p being essential for repairing CPDs in the rDNA locus (59) and by its capability to bind both Rad4p and Rad34p (18). In absence of Rad4p more Rad23 molecules would be available to form the active complex Rad23/Rad34p. However, the cellular ratio among Rad4p : Rad34p : Rad23p is 10 : 1 : 140

(from <http://yeastgfp.ucsf.edu>), which does not support the hypothesis that the amount of Rad23p is a limiting factor.

It was suggested, that Rad34p could be involved in TC-NER as Rad34p takes part in repair of the bottom strand (14). Our results definitively show that Rad34p contributes to NER mostly in the TS of active rDNA: or TC-NER of RNAPI (Figure 2E, *rad34Δ*). Moreover, examination of NER at the nucleotide level shows the presence of TC-NER downstream of nucleotide +40 (Figure 4C). Also, past nucleotide +40, repair of the TS is considerably slower in *rad34Δ* than in WT. These results demonstrate that Rad34p is essential for TC-NER and that TC-NER starts ~ 40 nucleotides downstream of nucleotide +1. Around the transcription initiation site (between nucleotides -10 and +34) repair is slow in the TS and very slow in the NTS, in both WT and *rad34Δ* cells. In *rad4Δ*, analyses of NER at the nucleotide level substantiate the existence of very fast repair in the TS of the coding region. In these cells there is no repair in the NTS of the coding region, in both DNA strands of the promoter and between rDNA units. Hence, strand specific repair between -10 and +34 requires Rad4p but not Rad34p and TC-NER from +40 onwards occurs in the absence of Rad4p but requires Rad34p.

The Rad4p is necessary for repair of RNAPII-transcribed genes, whereas Rad34 is not (14). Here we show that Rad4p is essential for repair in non-transcribed regions and at the transcription initiation site whereas Rad34p is not, and that Rad34p is required for TC-NER of the immediate downstream region where Rad4p has no role. Thus, although Rad4p and Rad34p share sequence homology (18, 31), their roles in repair are by and large distinct and complementary. However, we cannot completely exclude that Rad4p and Rad34p have at least small overlapping functions. In fact, in *rad4Δ* cells ~ 20% of CPDs are repaired from the NTS of active rDNA, and Rad34p could be responsible for this small NER activity. This is substantiated by the data showing that repair of the same NTS of active rDNA is ~ 15% less effective in *rad34Δ* than in WT cells (Figure 2E). Another possible explanation for the low (but statistically significant) level of repair in the NTS of *rad4Δ* active rDNA could be the occurrence of transcription in the opposite direction. However, in the yeast strains used for this study (*SIR2*⁺, *NRD1*⁺, *NAB3*⁺, *SEN1*⁺) there is no transcription of

rDNA running in the opposite direction (56). Moreover, we could not find anti-sense rRNA corresponding to the central portion of rDNA, which is the region where we have measured DNA repair (data not shown).

The distinct and complementary participation of Rad4p and Rad34p could reflect the state of the RNAPII transcription complex. Namely, transcription initiation requires: (i) melting of DNA to form an open complex, (ii) formation of the first few phosphodiester bonds, (iii) beginning of RNAPII movement, (iv) clearance of the promoter and (v) the formation of a steady-state ternary elongation complex. The melted DNA region starts upstream of the transcription initiation site (at -7 nt), expanding downstream and forming a transcription bubble of ~ 19 bp. Furthermore, RNAPII cover ~ 26 bp and clear the promoter at about nucleotide +12 (27). Thus, it is tempting to suggest that Rad4p (or GG-NER) is needed to repair rDNA from upstream of the transcription initiation site to the promoter clearance step, whereas Rad34p (or TC-NER) is needed during transcription elongation. However, the specific role of Rad34p during TC-NER of RNAPII remains unknown. Perhaps it could promote repair at sites where RNA polymerases are arrested by DNA lesions, similar to the roles proposed for Rad26p (and for the human homologue CSB) during TC-NER of RNAPII transcribed genes (29). Worthy of note, the CSB protein is also a component of RNAPII transcription in human cell lines and, thus, CSB/Rad26p could participate in NER of rRNA genes (5). Although it is not known whether Rad26p promotes RNAPII transcription in yeast, an early study considered the possibility that Rad26p might participate in repair of *total* rDNA. It was reported that Rad26p is not involved in NER of *total* rDNA (59). However, in the same study TC-NER could not be measured in *total* rDNA of WT yeast, leaving open the possibility that Rad26p could contribute in repair of the TS of active rDNA. Accurate measurements for DNA repair in the TS of both active and inactive rDNA, in WT and *rad26Δ* cells, are shown in Figure 5. Clearly, the data presented here prove that Rad26p does not participate in TC-NER of RNAPII-transcribed rDNA.

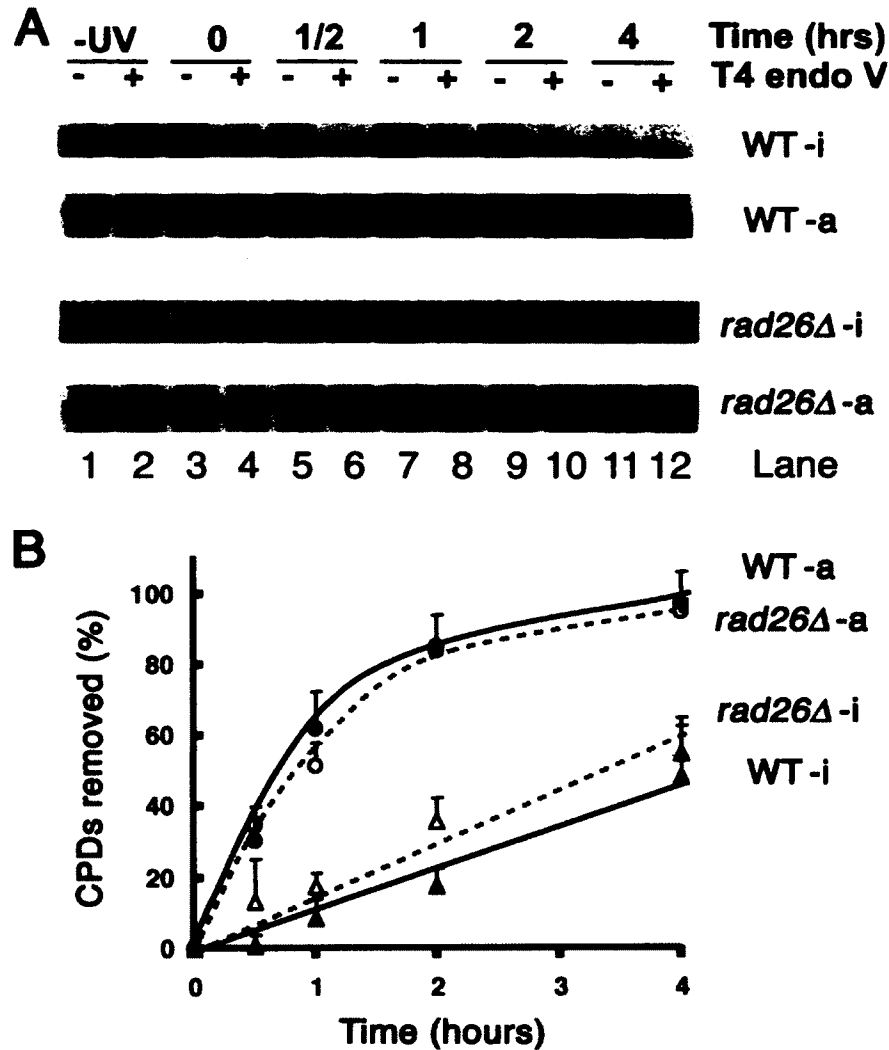


Figure 5. Repair of the transcribed strand (TS) in the coding regions of inactive and active rDNA, from WT and *rad26Δ* cells. (A) Nuclei were isolated from unirradiated and irradiated cells and digested with *EcoRI* as described in Figure 2. Their DNA isolated, redigested with *NheI*, mock-treated or treated with T4 endo V (denoted by – and +, respectively) and separated on a 1% alkaline agarose gel, blotted and hybridized with strand-specific riboprobes-A (see Figure 1A). Legend is as in Figure 2; inactive rDNA (i) and active rDNA (a). (B) Quantification of phosphorimages. Data are from active rDNA (circles) and inactive rDNA (triangles). Solid and open symbols represent data from the WT and *rad26Δ* strains, respectively. Data are the mean \pm 1 SD of 4 independent experiments.

Chromatin, chromatin remodeling and histone modification modulate NER activity (e.g., 51, 52, 54, 64, 66). We exploited the yeast rDNA locus and its two distinct structures to follow NER in chromatin (6). Canonical nucleosomes are not present in the coding regions of active rRNA genes, which are loaded with RNAPI molecules to a ratio of one RNAPI every 100 bp (i.e. about two RNAPI molecules every nucleosome DNA length) (37). Conversely, nucleosomes are found on the same coding DNA sequences in silent

genes, and on the majority of DNA between rDNA units (intergenic spacer or IS) (12, 30, 47). We observed that in WT cells nucleosomes hamper NER, since the NTS of active rDNA is repaired faster than both DNA strands of inactive rDNA. Moreover, the kinetics of NER for active and inactive rDNA are different: fast at the beginning and slow at the end in the coding region of active (non-nucleosome) rDNA, and uniformly slow in the coding region of inactive (nucleosome) rDNA. Similarly, uniform and slow repair rates occur in the IS (Figure 3). It is hypothesized that XPC makes compact chromatin accessible to NER. However, in *rad34Δ* repair of CPDs from inactive rDNA and from the IS are unaffected. Thus, although Rad34p shares sequence homology with XPC and Rad4p, it does not promote NER in arrays of nucleosomes. Even though the components of active (non-nucleosome) rDNA chromatin are unknown (53), active rDNA is largely devoid of histones, which are replaced with the protein Hmo1 (36). Hmo1p binds to the promoter and throughout the entire rDNA-coding region and enhances transcription (17, 26). Moreover, initiation of rDNA transcription begins with the assembly of UAF, CF, TBP, Rrn3p and RNAPI on the upstream element and core promoter (Figure 1A, lower panel; 39). Like NER (see above), photolyase repair of CPDs in the yeast rDNA sequences is hindered by the presence of nucleosomes, and photoreactivation experiments confirmed the presence of CF and UAF at rDNA regulatory regions (32, 33). In WT cells, NER is slow over the entire RNAPI promoter and downstream of the transcription initiation site up to nucleotide +34 (Figure 4C). Similarly, NER is slow in the RNAP-II and -III promoters (e.g., 9, 50). Thus, it is likely that RNA polymerases transcription initiation complexes obstruct the multi enzymatic mechanism of NER, which covers about 30 nucleotides around the damaged site (62). In *rad4Δ* the rDNA promoter, the inactive (nucleosome) rDNA coding region and the IS are not repaired, whereas the TS of active (non-nucleosome) rDNA is repaired. Since Rad4p co-purifies with the SWI/SNF chromatin-remodeling complex, it is suggested that it could recruit SWI/SNF to enhance repair in chromatin (20). However, in *rad4Δ* repair of the NTS of active (non-nucleosome) rDNA is severely reduced. Hence, the interpretation for an apparent role of Rad4p in repair of nucleosomes remains unclear, at least in the rDNA locus.

In conclusion, with this study we have added important information on the functions of the XPC family of proteins in NER. The current knowledge on the participation of Rad4p and Rad34p in NER of rDNA has been taken to the next level, and we provided insights on their roles during repair in nucleosome vs. non-nucleosome rDNA and in regulatory protein/DNA complexes at rDNA regulatory regions. Our results indicate that, although Rad4p and Rad34p share sequence homology, their roles in repair of rDNA are distinct. Rad4p is essential for repair in non-transcribed regions and at the transcription initiation site whereas Rad34p is not; Rad34p is required for TC-NER of the immediate downstream region where Rad4p has no role.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to J. Doyon at the Université de Sherbrooke and H. Gill at Cardiff University for technical help. MT, MP and AC were supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to AC. YT and RW were supported by a MRC programme award to RW.

REFERENCES

1. Baker-Brachmann, C., A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, and J.D. Boeke. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115-132.
2. Bardwell, A.J., L. Bardwell, N. Iyer, J.Q. Svejstrup, W.J. Feaver, R.D. Kornberg, and E.C. Friedberg. 1994. Yeast nucleotide excision repair proteins Rad2 and Rad4 interact with RNA polymerase II basal transcription factor b (TFIIH). *Mol. Cell. Biol.* 14: 3569-3576.
3. Bohr, V.A., and P.C. Hanawalt. 1985. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40: 359-369.
4. Bordi, L., F. Cioci, and G. Camilloni. 2001. In vivo binding and hierarchy of assembly of the yeast RNA polymerase I transcription factors. *Mol. Biol. Cell* 12: 753-760.
5. Bradsher, J., J. Auriol, L. Proietti de Santis, S. Iben, J.-L. Vonesch, I. Grummt, and J.-M. Egly. 2002. CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol. Cell* 10: 819-829.
6. Conconi, A. 2005. The yeast rDNA locus: a model system to study DNA repair in chromatin. *DNA Rep.* 4: 897-908.
7. Conconi, A., V.A. Bessalov, and M.J. Smerdon. 2002. Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 649-654.
8. Conconi, A., V.A. Bessalov, D. Fahy, and M.J. Smerdon. 2005. DNA repair in RNA polymerase I transcribed genes. In *From DNA Photolesions to Mutations, Skin Cancer and Cell death: Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences*, Sage E Drouin R Rouabhia M (eds) pp 123-147. RSC Publishing
9. Conconi, A., X. Liu, L. Koriazova, E.J. Ackerman, and M.J. Smerdon. 1999. Tight correlation between inhibition of DNA repair in vitro and transcription factor IIIA binding in a 5S ribosomal RNA gene. *EMBO J.* 18: 1387-1396.
10. Conconi, A., M. Paquette, D. Fahy, V.A. Bessalov, and M.J. Smerdon. 2005. Repair-independent chromatin assembly onto active ribosomal genes in yeast after UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* 25: 9773-9783.
11. Conconi, A., R.M. Widmer, T. Koller, and J.M. Sogo. 1989. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* 57: 753-76.

12. Dammann, R., R. Lucchini, T. Koller, and J.M. Sogo. 1993. Chromatin structure and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* 21: 2331–2338.
13. Dammann, R., R. Lucchini, T. Koller, and J.M. Sogo. 1995. Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5294–5303.
14. den Dulk, B., J.A. Brandsma, and J. Brouwer. 2005. The Rad4 homologue YDR314C is essential for strand-specific repair of RNA polymerase I-transcribed rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 56: 1518–1526.
15. den Dulk, B., S.M. Sun, M. de Ruijter, J.A. Brandsma, and J. Brouwer. 2006. Rad33, a new factor involved in nucleotide excision repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Rep.* 5: 683–692.
16. Friedberg, E.C., G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood, R.A. Schultz, and T. Ellenberger. 2006. *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, D.C.
17. Gadai, O., S. Labarre, C. Boschiero, and P. Thuriaux. 2002. Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J.* 21: 5498–5507.
18. Gavin, A.C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, et al. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141–147.
19. Gillette, T.G., S. Yu, Z. Zhou, R. Waters, S.A. Johnson, and S.H. Reed. 2006. Distinct functions of ubiquitin-proteasome pathway influence nucleotide excision repair. *EMBO J.* 25: 2529–2538.
20. Gong, F., D. Fahy, and M.J. Smerdon. 2006. Rad4-Rad23 interaction with SWI/SNF links ATP-dependent chromatin remodeling with nucleotide excision repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 902–907.
21. Guzder, S.N., V. Bailly, P. Sung, L. Prakash, and S. Prakash. 1995. Yeast DNA repair protein RAD23 promotes complex formation between transcription factor TFIIH and DNA damage recognition factor RAD14. *J. Biol. Chem.* 270: 8385–8388.
22. Guzder, S.N., Y. Habraken, P. Sung, L. Prakash, and S. Prakash. 1995. Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH. *J. Biol. Chem.* 270: 12973–12976.
23. Guzder, S.N., P. Sung, L. Prakash, and S. Prakash. 1998. Affinity of yeast nucleotide excision repair factor 2, consisting of the Rad4 and Rad23 proteins, for ultraviolet damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 273: 31541–31546.

24. Grummt, I., and C.S. Pikaard. 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 641-649.
25. Hara, R., J. Mo, and A. Sancar. 2000. DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9173-9181.
26. Hall, D.B., J.T. Wade, and K. Struhl. 2006. An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26: 3672-3679.
27. Kahl, B.F., H. Li, and M.R. Paule. 2000. DNA melting and promoter clearance by eukaryotic RNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 299: 75-89.
28. Jansen, L.E.T., R.A. Verhage, and J. Brouwer. 1998. Preferential binding of yeast Rad4–Rad23 complex to damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 273: 33111–33114.
29. Lainé, J.-P., and J.-M. Egly. 2006. When transcription and repair meet: a complex system. *Trends in Genet.* 22: 430-436.
30. Lucchini, R., and J.M. Sogo. 1998. The dynamic structure of ribosomal RNA gene chromatin, p. 255–276. *In* M.R. Paule (ed.), *Transcription of ribosomal genes by eukaryotic RNA polymerase I*. Springer-Verlag and RG Landes Company
31. Marti, T.M., C. Kunz, and O. Fleck. 2003. Repair of damaged and mismatched DNA by the XPC homologues Rhp41 and Rhp42 of fission yeast. *Genetics* 164: 457-467.
32. Meier, A., and F. Thoma. 2005. RNA polymerase I transcription factors in active yeast rRNA gene promoters enhance UV damage formation and inhibit repair. *Mol. Cell. Biol.* 25: 1586-1595.
33. Meier, A., M. Livingstone-Zatchej, and F. Thoma. 2002. Repair of active and silenced rDNA in yeast. *J. Biol. Chem.* 277: 11845-11852.
34. Mellon, I., V.A. Bohr, C.A. Smith, and P.C. Hanawalt. 1986. Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 8878–8882.
35. Mellon, I., G. Spivak, and P.C. Hanawalt. 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian *DHFR* gene. *Cell* 51: 241–249.
36. Merz, K., M. Hondele, H. Goetze, K. Gmelch, U. Stoeckl, and J. Griesenbeck. 2008. *Genes and Dev.* 22: 1190-1204.
37. Miller, O.L. Jr, and B.R. Beatty. 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science* 164: 955-957.

38. Min, J.-H., and N.P. Pavletich. 2007. Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature* 449: 570-576.
39. Moss, T. 2004. At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr. Op. Genet. Dev.* 14: 210-217.
40. Mu, D., D.S. Hsu, and A. Sancar. 1996. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J. Biol. Chem.* 271: 8285-8294.
41. Muller, M., R. Lucchini, and J.M. Sogo. 2000. Replication of yeast rDNA initiates downstream of transcriptionally active genes. *Mol. Cell* 5: 767-777.
42. Nomura, M. 2001. Ribosomal RNA genes, RNA polymerases, nucleolar structures, and synthesis of rRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor. Quant. Biol.* 66: 555-565.
43. Prakash, S., and L. Prakash. 2000. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation Res.* 451: 13-24.
44. Reed, S.H., and T.G. Gillette. 2007. Nucleotide excision repair and the ubiquitin proteasome pathway—Do all roads lead to Rome? *DNA Rep* 6: 149-156.
45. Smerdon, M.J., and F. Thoma. 1990. Site-specific DNA repair at the nucleosome level in a yeast minichromosome. *Cell* 61: 675-684.
46. Smith, J.S., E. Caputo, and J.D. Boeke. 1999. A genetic screen for ribosomal DNA silencing defects identifies multiple DNA replication and chromatin-modulating factors. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3184-3197.
47. Sogo, J.M., and F. Thoma. 2003. The structure of rDNA chromatin, p. 1-15. *In* M.O.J. Olson (ed.), *The nucleolus*. Kluwer Academic/Plenum publishers
48. Sugawara, K., and F. Hanaoka. 2007. Sensing of DNA damage by XPC/Rad4: one protein for many lesions. *Nat. Struc.Mol. Biol.* 14: 887-888.
49. Takeshi, Y., S. Kaoru, S. Yuichiro, I. Shigenori, S. Tadahiro, and H. Fumio. 2005. Nucleosomal structure of undamaged DNA regions suppresses the non-specific DNA binding of the XPC complex. *DNA Rep.* 4: 389-395.
50. Teng, Y., S. Li, R. Waters, and S.H. Reed. 1997. Excision repair at the level of the nucleotide in the *Saccharomyces cerevisiae* MFA2 gene: mapping of where enhanced repair in the transcribed strand begins or ends and identification of only a partial rad16 requisite for repairing upstream control sequences. *J. Mol. Biol.* 267: 324-337.
51. Teng, Y., H. Liu, H.W. Gill, Y. Yu, R. Waters, and S.H. Reed. 2008. *Saccharomyces cerevisiae* Rad16 mediates ultraviolet-dependent histone H3 acetylation required for efficient global genome nucleotide-excision repair. *EMBO Rep.* 9: 97-102.

52. Teng, Y., Y. Yu, and R. Waters. 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* histone acetyltransferase Gcn5 has a role in the photoreactivation and nucleotide excision repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene. *J. Mol. Biol.* 316: 489-499.
53. Toussaint, M., G. Levasseur, M. Tremblay, M. Paquette, and A. Conconi. 2005. Psoralen photocrosslinking, a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I – transcribed ribosomal genes. *Biochem. Cell Biol.* 83: 449-459.
54. Tremblay, M., M. Toussaint, A. D'Amours, and A. Conconi. (In press). Nucleotide excision repair and photolyase repair of UV photoproducts in nucleosomes; assessing the existence of nucleosome and non-nucleosome rDNA chromatin *in vivo*. *Biochem. Cell Biol.*
55. van Gool, A.J., R. Verhage, S.M.A. Swagemakers, P. van de Putte, J. Brouwer, C. Troelstra, D. Bootsma, and J.H.J. Hoeijmakers. 1994. RAD26, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene *ERCC6*. *EMBO J.* 13: 5361–5369.
56. Vasiljeva, L., M. Kim, N. Terzi, L.M. Soares, and S. Buratowski. 2008. Transcription termination and RNA degradation contribute to silencing of RNA polymerase II transcription within heterochromatin. *Mol. Cell* 29: 313-323.
57. Venema, J., A. van Hoffen, V. Karcagi, A.T. Natarajan, A.A. van Zeeland, and L.H.F. Mullenders. 1991. Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C Cells Remove Pyrimidine Dimers Selectively from the Transcribed Strand of Active Genes. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4128-4134.
58. Venema, J., A. van Hoffen, A.T. Natarajan, A.A. van Zeeland, and L.H.F. Mullenders. 1990. The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA. *Nucl. Acids Res.* 18: 443–448.
59. Verhage, R.A., P. van de Putte, and J. Brouwer. 1996. Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: RAD4-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polymerase I transcribed genes. *Nucl. Acids Res.* 24: 1020-1025.
60. Verhage, R.A., A.-M. Zeeman, N. De Groot, F. Gleig, D. Duong Bang, P. van de Putte, and J. Brouwer. 1994. The RAD7 and RAD16 genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from the silent mating type loci, are also required for repair of the nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6135-6142.
61. Vogelauer, M., F. Cioci, and G. Camilloni. 1998. DNA protein-interactions at the *Saccharomyces cerevisiae* 35 S rRNA promoter and in its surrounding region. *J. Mol. Biol.* 275: 197-209.

62. Wakasugi, M., and A. Sancar. 1998. Assembly, subunit composition, and footprinting of human DNA repair excision nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6669–6674.
63. Wang, Z., S. Wei, S.H. Reed, X. Wu, J.Q. Svejstrup, W.J. Feaver, R.D. Kornberg, and E.C. Friedberg. 1997. The RAD7, RAD16, and RAD23 genes of *Saccharomyces cerevisiae*: Requirement for transcription-independent nucleotide excision repair in vitro and interactions between the gene products. *Mol. Cell. Biol.* 17: 635–643.
64. Waters, R., and M.J. Smerdon. 2005. Nucleotide excision repair in chromatin: searching for the key to enter. *DNA Rep. (Suppl)* 4: 853–950.
65. Watkins, J.F., P. Sung, L. Prakash, and S. Prakash. 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7757–7765.
66. Yu, Y., Y. Teng, H. Liu, S.H. Reed, and R. Waters. 2005. UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8650–8655.

Chapitre 2

Les lésions causées par le rayonnement UVC causent la chute de l'ARN polymérase I et une formation de nucléosomes sur l'ADN ribosomal

UV light-induced DNA lesions cause dissociation of yeast RNA polymerase-I and inactivation of rRNA genes concomitantly to nucleosomes loading.

Maxime Tremblay, Romain Charton, Manuel Wittner, Geneviève Levasseur, Joachim Griesenbeck & Antonio Conconi
Soumis à Molecular Cell.

2.2. Avant-propos

Ma contribution initiale pour cet article fut au niveau de la planification et l'identification des expériences nécessaires pour cet article. J'ai participé à la rédaction de la première version de ce manuscrit (principalement rédigé par A. Conconi) ainsi qu'à la révision des versions suivantes.

De plus, j'ai entièrement réalisé les expériences présentées dans les figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6, ainsi que les figures supplémentaires S1, S2. Les figures 7 et 8 ainsi que des images originales (figures S5 et S6) furent effectuées conjointement par R. Charton et M. Wittner. De plus R. Charton a effectué les travaux présentés dans la figure S3. Finalement, ma contribution totale, au niveau des expériences présentées et du temps nécessaire à les effectuer, se chiffre à plus de 90%.

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteur(s), co-auteur(s) de l'article intitulé :

UV light induced DNA lesions cause dissociation of yeast RNA polymerase-I and inactivation of rRNA genes concomitantly to nucleosomes loading.

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire ☐ de la thèse ☒

de l'étudiant(e) (nom) : **Maxime Tremblay**

inscrit(e) au programme de **Microbiologie**

de la Faculté de **Médecine et des Sciences de la Santé** de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature _____ Date : **28/01/2013**

Nom **Romain Charton**

Coordonnées **Département de Microbiologie et Infectiologie**

Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke

PRAC - 3201, Rue Jean-Mignault, Québec, Canada. J1E 4K

Signature **H** _____ Date : **28.01.2013**

Nom **Manuel Wittner**

Coordonnées **Lehrstuhl Biochemie III, Universität Regensburg,**

Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie

93053 Regensburg, Germany

Signature _____ Date : **7/03/2013**

Nom **Geneviève Levesque**

Coordonnées **Département de Microbiologie et Infectiologie**

Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke

PRAC - 3201, Rue Jean-Mignault, Québec, Canada. J1E 4K

Signature _____ Date : **24.01.2013**

Nom **Joschika Griesenbeck**

Coordonnées **Lehrstuhl Biochemie III, Universität Regensburg,**

Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie

93053 Regensburg, Germany

Signature **S** _____ **28.01.2013**

Nom **Antonio Conconi**

Coordonnées **Département de Microbiologie et Infectiologie**

Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke

PRAC - 3201, Rue Jean-Mignault, Québec, Canada. J1E 4K*

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

La cytotoxicité des lésions à l'ADN induites par la lumière UV est causée par leur interférence avec les processus de la transcription et de la réplication. Les polymérases à ARN en élongation arrêteront aux photoproduits. Cet arrêt est reconnu comme étant un événement déclencheur de la réparation couplée à la transcription, une sous-voie de la réparation par excision de nucléotides, qui supprimera la lésion bloquant la polymérase. Les gènes ribosomaux sont fortement transcrits et sont densément recouverts de polymérases à ARN I. Étant donné que les polymérases à ARN I peuvent réduire l'accessibilité des photoproduits aux facteurs de réparation, elles pourraient être retirées, mais leur destin n'est pas encore défini. Afin d'élucider ce qu'il advient aux polymérases à ARN I arrêtées aux photoproduits *in vivo*, cinq méthodes différentes basées sur l'immunoprécipitation de la chromatine, la microscopie électronique, le « *run-on* » transcriptionnel, le photo-pontage au psoralène et le clivage endogène de la chromatine (ChEC), furent employés. Les résultats présentés dans cette étude révèlent que la plupart des polymérases à ARN I se dissocient des gènes de l'ARNr endommagés, avec l'inactivation de gènes et le dépôt des nucléosomes effectué de façon simultanée. De plus, les polymérases à ARN I s'entassaient dans la région 5' du gène. Cet effet est probablement causé par une initiation de la transcription suivi d'une élongation et d'une pause/relâchement de la polymérase à la première lésion de l'ADN rencontrée. Même lorsque les lésions ne sont pas réparées, une initiation continue de la transcription est observée et supportée par la présence d'une grande quantité de polymérases à ARN I et des facteurs d'initiation de la transcription. La transcription complète et le retour des gènes actifs de l'ARNr s'observe suite à la réparation de l'ADN.

Veuillez noter que des aspects supplémentaires n'ayant pas été mentionnés dans cet article seront abordés dans la discussion (section 5.2). Il est suggéré de lire cette partie de la discussion suite à la lecture de ce chapitre.

ABSTRACT

The cytotoxicity of UV light-induced DNA lesions results from their interference with transcription and replication. Elongating RNA polymerases arrest at photoproducts, an event that triggers transcription-coupled repair, the sub-pathway of nucleotide excision repair that removes obstructions to transcription. Ribosomal genes are transcribed at very high rate and are densely loaded with RNA polymerase-I. Since arrested RNA polymerases-I can reduce the accessibility of repair factors to photoproducts, they might be moved but their fate is not clear. To depict the outcome of arrested RNA polymerase-I at photoproducts *in vivo*, five different assays based on: chromatin-immunoprecipitation, electron microscopy, transcription run-on, psoralen-crosslinking and chromatin endogenous cleavage, were employed. The findings reported in this study reveal that most RNA polymerase-I complexes dissociated from damaged rRNA genes, concomitant with gene inactivation and deposition of nucleosomes. In addition, RNA polymerases-I piled up at the 5'-end of the gene, likely due to transcription initiation followed by elongation and pausing/release at the first DNA lesion. Even when DNA lesions were not repaired, continuous transcription initiation was supported by the presence of pools of RNA polymerase-I and transcription initiation factors. Transcription and active ribosomal genes in chromatin were restored only after DNA repair.

INTRODUCTION

UV light-induced DNA lesions, like cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), are removed by nucleotide excision repair (NER). NER is subdivided into global genome repair (GGR), that repairs inactive DNA and the non transcribed strand (NTS) of active genes, and transcription coupled repair (TCR) that repairs the transcribed strand (TS) of active genes only. In humans, the same 5 XP (*xeroderma pigmentosum*) gene products are required for both sub-pathways. In addition, GGR requires XPC and XPE whereas TCR requires CSA and CSB (Cockayne syndrome proteins A and B). During NER: after DNA damage recognition, strand incisions on both sides of the damage and excision of a short strand containing the lesion, DNA synthesis takes place using the complementary DNA strand as template (Friedberg et al., 2006). CPDs in the TS block transcription and it is believed that arrested RNA polymerase-II (RNAPII) trigger TCR. Thus, the hallmark of TCR is the fast removal of obstructions that impede elongation by RNA polymerases (Bohr, Smith, Okumoto, & Hanawalt, 1985; Hanawalt & Spivak, 2008; Mellon, Spivak, & Hanawalt, 1987). The understanding of TCR has progressed considerably. Namely, arrested RNAPII signals the presence of DNA damage, recruiting the transcription-repair coupling factor (CSB in human; Rad26 in *S. cerevisiae*) as well as the NER factors TFIIH, RPA, XPA, XPG and XPF (Lainé & Egly, 2006). CSA and chromatin associated factors also participate in TCR (Fousteri, Vermeulen, Van Zeeland, & Mullenders, 2006). After signaling the presence of DNA damage on the TS, arrested RNAPII might be displaced, a process that would provide access of NER factors to the DNA lesion. One model proposes that RNAPII are released from the DNA and a second model that they are moved from the damaged site by reverse translocation (Tornaletti, 2009). A third model suggests that an arrested RNAPII does not prevent the accessibility of NER factors to the DNA lesion but that RNAPII could undergo conformational changes (Fousteri & Mullenders, 2008). Finally a very low but detectable amount of RNAPII bypasses CPDs, and the mechanism for this translesion was elucidated *in vitro* (Marietta & Brooks, 2007; Walmacq et al., 2012). Therefore despite the advanced knowledge on TCR, the outcome of RNAPII encountering DNA lesions is not clear. Even less is known about the fate of RNA polymerase-I (RNAPI)

on damaged ribosomal genes (rRNA genes or rDNA).

The multiple copies of rRNA genes (~150 in yeast) are organized in tandem repeats, of which only a fraction is transcribed. Psoralen crosslinking and chromatin endogenous cleavage analyses showed that inactive rRNA genes are assembled in nucleosomes, whereas active rRNA genes are largely depleted of nucleosomes (Conconi *et al*, 1989; Dammann *et al*, 1993; Wittner *et al*, 2011, reviewed in Sogo & Thoma, 2003) but densely loaded with RNAPI and the non-histone protein Hmo1 (Merz *et al.*, 2008). The presence of two chromatin structures in the rDNA locus was demonstrated for a large variety of organisms, ranging from yeast to human (Toussaint, Levasseur, Tremblay, Paquette, & Conconi, 2005). The synthesis of rRNA is regulated by the transcription initiation rate, the number of active rRNA genes and, at least in human cells, by the elongation rate of RNAPI (Banditt, Koller, & Sogo, 1999; Dammann *et al.*, 1993; Fahy, Conconi, & Smerdon, 2005; French, Osheim, Cioci, Nomura, & Beyer, 2003; Stefanovsky, Langlois, Gagnon-Kugler, Rothblum, & Moss, 2006). In yeast, initiation of transcription requires the assembly of the upstream activating factor (UAF) on the upstream element (UE) and of the core factor (CF) on the core element (CE), of the TATA binding protein, and of RNAPI in complex with Rrn3. However, whereas UAF binds to the promoters of both inactive and active rRNA genes, CF mostly binds to the promoters of active rRNA genes (Keys *et al.*, 1994; Meier & Thoma, 2005). Remarkably after UV irradiation of yeast cells, transcription of rRNA genes stops and inactive chromatin forms on what were the active rRNA genes. As repair proceeds, transcription recovers and the active chromatin is restored. Conversely, in NER deficient mutants (*rad1Δ* and *rad14Δ*) transcription does not recover and inactive chromatin is not removed from what were the active rRNA genes before irradiation (Conconi, Paquette, Fahy, Bessalov, & Smerdon, 2005). It was hypothesized that the formation of inactive rDNA chromatin could result from the displacement of RNAPI from the damaged TS and the deposition of nucleosomes (Conconi *et al.*, 2005). In this work we addressed the outcome of elongating RNAPI on the damaged TS of rRNA genes during NER. Our findings revealed striking correlation between presence of CPDs, block of rDNA transcription, dissociation of RNAPI and HmoI, and loading of histones.

MATERIAL AND METHODS

Yeast strains, cells growth and UV irradiation.

Yeast cells [*S. cerevisiae*, RPA190-TAP (Euroscarf), the isogenic *rad14Δ* and *rad34Δ* mutants and the JS311 (*RAD*+) strain (Smith, Caputo, & Boeke, 1999), and micrococcal nuclease tagged strains (Merz et al., 2008); see table S1] were grown in complete medium (YEPD) to early log-phase ($\sim 1.2 \times 10^7$ cells/ml). Cultures were washed and resuspended in ice cold PBS (137 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0) to a final concentration of 2×10^7 cells/ml. Cell suspensions were irradiated (254 nm) with a UV dose of 180 J/m^2 (UVX radiometer; Ultra-Violet Products, Upland, USA), harvested, resuspended in YEPD and incubated in the dark at 30°C with continuous shaking for different repair times (0.5 to 4 hours).

Table S1 : Yeast strains used in this study.

Strain	Parent	Genotype	Origin
JS311		MAT α , his3 Δ 200, leu2 Δ 1, met15 Δ 0, trp1 Δ 63, ura3-167, RDN1::Ty1-MET15, mURA3/HIS3	Smith <i>et al.</i> , 1999
JS311-A190MN	JS311	JS311 made RPA190-MNase-3xHA::KanMX6	This study
JS311-A190MN <i>Rad14Δ</i>	JS311-A190MN	JS311-A190MN made <i>rad14Δ</i> ::LEU2	This study
JS311-HMO1MN	JS311	JS311 made HMO1-MNase-3xHA::KanMX6	This study
JS311-HMO1MN <i>rad14Δ</i>	JS311-HMO1MN	JS311-HMO1MN made <i>rad14Δ</i> ::LEU2	This study
JS311-H2AMN	JS311	JS311 made HTA1-MNase-3xHA::KanMX6	This study
JS311-H2AMN <i>rad14Δ</i>	JS311-H2AMN	JS311-H2AMN made <i>rad14Δ</i> ::LEU2	This study
JS311-H3MN	JS311	JS311 made HHT1-MNase-3xHA::KanMX6	This study
JS311-H3MN <i>rad14Δ</i>	JS311-H3MN	JS311-H3MN made <i>rad14Δ</i> ::LEU2	This study

JS306-A190MN	JS306	MATa, his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ0, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty1-MET15, mURA3/HIS3, RPA190-MNase-3xHA::KanMX6	This study
JS306-A190MN- <i>bar1Δ</i>	JS306-A190MN	JS306-A190MN made <i>bar1Δ</i> ::TRP1	This study
190TAP		MATa, ade2, arg4, leu2, trp1-289, ura3-52, RPA190::TAP-K.I.URA3	Euroscarf
190TAP- <i>rad14Δ</i>	190TAP	190TAP made <i>rad14Δ</i> ::KanMX	This study
y618	NOY505	MATa; ade2-1; ura3-1; trp1-1; leu2-3,112; his3-11; can1-100; UAF30-MNase-3xHA::KanMX6	Merz <i>et al.</i> , 2008
y1141	NOY505	MATa; ade2-1; ura3-1; trp1-1; leu2-3,112; his3-11; can1-100; RRN11-MNase-3xHA::KanMX6	Merz <i>et al.</i> , 2008

T4 endonuclease digestion, alkaline gel electrophoresis and quantification of CPD yield.

DNA was isolated from irradiated and non-irradiated (control) cells, digested with restriction enzymes and cleaved specifically at CPD sites by T4 endonuclease V (T4 endo V; Epicentre) as described in (Smerdon & Thoma, 1990). DNA strands were separated on 1% alkaline agarose gels and transferred to Hybond-XL membrane (GE-Healthcare). After hybridization with radiolabeled DNA probes, quantification of CPDs was done on data from phosphorimages using ImageQuant software (GE-Healthcare). Measurement of CPDs was calculated as described elsewhere (Mueller & Smerdon, 1995). Briefly, CPD per DNA fragment were determined as following: the volume (V) of each band (\pm UV and \pm T4 endo V) was corrected by subtracting its average background, which is the sum of equal signal volumes measured above and below the band and divided by 2. Using the corrected volumes, the following equation was applied: CPDs / DNA fragment = $\ln (V_{-T4endoV} / V_{+T4endoV})$. The percentage of undamaged fragments was obtained by calculating the ratio $V_{+T4endoV} / V_{-T4endoV}$.

Nuclei isolation, psoralen crosslinking and DNA extraction.

Cells disruption, nuclei preparation and DNA purification were done as in (Conconi, Bespalov, & Smerdon, 2002). Crosslinking of nuclei was done in 24-multiwell plates (Falcon, uncoated). Psoralen (4,5',8-trimethylpsoralen, Sigma) stock solution (400 µg/ml) was added at a volume equal to 0.025 x nuclei suspension volume. After 5 min on ice in the dark, the nuclear suspension was irradiated on ice for 10 min using a UV light box (25W Transilluminator, UVP, CA). The purified DNA samples were digested with the appropriate restriction enzymes and separated onto agarose gel electrophoresis as described in (Conconi et al., 2002).

Chromatin immuno-precipitation (ChIP), protein extraction and western blotting.

Proteins to DNA crosslinking was done as following: after addition of 1.4 ml of 37% formaldehyde to 50 ml of cells suspension, the samples were incubated at room temperature for 20 min. Thereafter, cells were collected by centrifugation and the pellets washed 3 times in ice cold TBS (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl). After the final wash, the pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The cell pellets were resuspended in 700 µl of Lysis-buffer [50 mM HEPES (pH 7.5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate, 1 mM PMSF], together with protease inhibitors (1M benzamidine, 10 mg/ml aprotinin, 1mg/ml leupeptin and 1mg/ml pepstatin). Rupture of cells was done by adding 400 µl of glass beads (425-600 µm; Sigma) and vortexing at maximum speed for 2 hours at 4°C. Cell lysates were separated from the glass beads, centrifuged and the pellets resuspended in Lysis-buffer with protease inhibitors to a final volume of 1.1 ml. Shearing of chromatin by sonication was done to obtain DNA fragments with an average length of 400 bp. After centrifugation the supernatants were transferred into new tubes and kept on ice. From each sample, 5 µl aliquots labeled whole cell extract (WCE) were stored at -20°C. In parallel, 500 µl of WCE were mixed with 30 µl of Protein-G agarose beads and incubated overnight with rotation at 4°C. After centrifugation (6 krpm, 2 min, 4°C), the pellets were washed 2 times in Lysis-buffer without protease inhibitors, 2 times in Lysis-buffer with 360 mM NaCl, 2 times in Wash-

buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 250 mM LiCl, 0.5% NP40, 0.5% Na-Deoxycholate, 1 mM EDTA] and 1 time in TE buffer. The final pellets were resuspended in 100 μ l of Elution-buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1% SDS] and incubated at 65°C for 10 min. After centrifugation, 90 μ l of each supernatant were collected and 100 μ l of TE/SDS [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1% SDS] were added to the remaining 10 μ l, followed by incubation at 65°C for 10 min. After centrifugation, 90 μ l of each supernatant were collected and added to the first collected 90 μ l, together with an additional 120 μ l of TE/SDS (total 300 μ l). In parallel, 95 μ l of TE/SDS were added to the 5 μ l aliquots of WCE. The samples were incubated overnight at 65°C. The following day, 140 μ l TE were added, together with 3 μ l of glycogen (Roche, Mannheim, Germany) and 2.5 μ l of RNase A (10 μ g/ μ l). After one hour-incubation at 37°C, 7.5 μ l of Proteinase K (20 mg/ml) were added followed by an additional one hour-incubation at 37°C. DNA was purified 2 times with phenol:chloroform (1:1) and 1 time with chloroform, then precipitated in ethanol. The DNA pellets were resuspended in 100 μ l TE and quantitative PCR was done as recommended by the manufacturer.

Total proteins were isolated by resuspending cells in 150 μ l of 1.85 M NaOH and 7.5% β -mercaptoethanol for 15 min on ice. Thereafter 150 μ l of 55% TCA were added to each sample, followed by an incubation of 10 min on ice. After centrifugation at 18,000 g for 10 min at 4°C, the supernatants were discarded and 200 μ l of storage buffer (62.5 mM Tris pH 8.8 2% SDS, 10% glycerol) were added to each pellet. The concentration of proteins was measured using the Bradford method (Noble & Bailey, 2009), and 0.5 μ g/ μ l of each sample was diluted in Laemmli buffer (62.5 mM Tris pH 8.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue). Protein electrophoresis was done on an 8% SDS-PAGE and western blotting was performed according to the standard procedure.

ChEC-psoralen.

ChEC-psoralen was done essentially as previously described (Merz et al., 2008): 80 μ l of nuclei suspensions ($\sim 2.8 \times 10^8$ cells), isolated from formaldehyde-crosslinked cells, were either mock treated or incubated with CaCl_2 (2 mM final concentration) for the indicated times at 30°C. The reactions were stopped by addition of 100 μ l of IRN buffer (50mM Tris-HCl pH8, 20mM EDTA and 0.6M NaCl). Then, the nuclei suspensions were transferred to a 24-multiwell plate, and 4,5',8-trimethylpsoralen (Sigma) in ethanol was added to a final concentration of 10 μ g/ml. Psoralen crosslinking was done as previously described (Conconi et al., 2002). RNase A was added to a final concentration of 100 μ g/ml followed by incubation at 37°C for 1 h. After addition of 1/40 vol of 20% SDS and proteinase K to a final concentration of 100 μ g/ml, incubation was continued for 1 h at 55°C. Formaldehyde cross-links were reverted overnight at 65°C. DNA was extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), precipitated with ethanol, and suspended in TE.

Miller spreading.

Yeast cells were grown as described above and prepared for Miller spreading essentially as described in (Osheim, French, Sikes, & Beyer, 2008). The yeast cell wall was partially digested with Zymolyase (USbiologicals) in 1 M Sorbitol and 250 mM EDTA (pH 8.0) during 4 minutes at 30°C. Cells were collected by quick centrifugation and the supernatant removed. To the pellets 1 ml of Triton X-100 (0.025% v/v in water, pH 9.0; Fisher Scientific) was added and incubated for 5 minutes at room temperature. The electron microscopy (EM) grids (300 mesh carbon coated; CF300-Cu, Cedarlane) were dehydrated in 100% ethanol and then rinsed 3 times in sucrose-formaldehyde (0.1M sucrose, 10% v/v formaldehyde, pH 8.7). The rinsed grids were placed at the bottom of centrifugation chambers and covered with a cushion of sucrose-formaldehyde. Finally, 7 μ l of cells lysate were gently added on top of the sucrose-formaldehyde cushion followed by centrifugation. After centrifugation, the sucrose-formaldehyde solution was removed and the EM grids rinsed with a solution of Photo-Flo 200 (Kodak) (0.06% v/v Photo-Flo 200 in water, pH 8.9). The grids were removed, air-dried and stained: first in (1:1) 95% ethanol : 4% (w/v

dH₂O) phosphotungstic acid (PTA, #HT152 Sigma)] for 30 seconds, and then rinsed twice in 100% ethanol, followed by a second staining in (1:1) 95% ethanol : 4% (w/v dH₂O) uranyl acetate (#16239222400, Cedarlane)] for 1 minute and by 3 final rinses in 100% ethanol. The samples were air-dried before visual analysis with a Hitachi H-7500 TEM.

Transcription run-on (TRO) and slot-blot detection of rRNA.

The TRO reaction mixture contained 1 mM each of ATP, CTP and GTP, 80 μ M UTP, 5 mM magnesium acetate, 90 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 8% glycerol, 0.1 mM EDTA pH 8.0, 5 mM DTT and 100 μ Ci [α -³²P]UTP (800Ci/mmol). Nuclei in NIB buffer (Conconi et al., 2002) were thawed on ice and 100 μ l aliquots of each ($\sim 2 \times 10^8$ cells) were added to 100 μ l of TRO reaction mixture. The samples were held on ice for 5 min and the TRO reactions were initiated by transferring the samples to a 25°C heatblock where transcription was allowed to occur for 10 min. Transcription was stopped by the addition of 1 ml Trizol (Invitrogen) and RNA was isolated according to the manufacturer. The RNA samples were quantified spectrophotometrically, based on absorbance at 260 nm, in order to use approximately equivalent amounts for hybridization. Using a slot-blot apparatus, duplicate samples of each rDNA fragment were immobilized on Hybond-XL membrane (GE-Healthcare) that was first rinsed in 2 \times SSC (0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate). After applying 2 μ g of each DNA fragment diluted in 0.4 N NaOH, the slots were washed with 0.4 N NaOH and the membranes were extensively rinsed in 0.5 M Sodium phosphate before pre-hybridization. Hybridizations to the radiolabeled RNA from TRO reactions were done at 68°C, as described in (Conconi et al., 1989). The membranes were exposed to phosphorimager screens and the resulting signals were quantified using ImageQuaNT software (GE-Healthcare).

RESULTS

CPD formation in the rRNA gene 5'-end and contiguous sequences.

Yeast cells, carrying the tandem affinity purification (TAP) tagged RPA190 subunit of RNAPI (Tab S1), were treated with a dose of 180 J/m^2 and harvested soon after irradiation. Total DNA was purified, digested with the appropriate restriction enzymes (Fig 1A) and treated with T4 endo V, which cleaves DNA specifically at CPDs (Fig 1B). At these UV doses ~ 5.0 CPDs were induced in the TS of the rDNA coding region (6.86 kb), 1.0 ± 0.2 CPDs were induced in the 1.39 kb *SmaI-ApaI* fragment and 1.1 ± 0.05 CPDs in the 1.41 kb *ApaI* fragment (± 1 SD of 3 independent experiments). These measurements correspond to ~ 0.7 and ~ 0.8 CPDs per kb, respectively. DNA length affects the frequency at which CPDs form, and ~ 0.6 CPDs are expected in the 0.86 kb *EcoRI-ApaI* fragment. Consequently, on average, $\sim 87.3\%$ of the rRNA genes have at least 1 CPD in the 2.96 kb fragment, $\sim 61.3\%$ of the rRNA genes have at least 1 CPD in the 1.39 kb fragment and $\sim 37.9\%$ of the rRNA genes have at least 1 CPD in the 0.86 kb fragment. In the rDNA locus, removal of CPDs is fast at the beginning (about 40 and 60% of CPDs are repaired after 15 and 30 min, respectively) and gradually decreases thereafter (about 65, 80 and 90% of CPDs are repaired after 1, 2 and 4 hours, respectively) (Conconi et al., 2005).

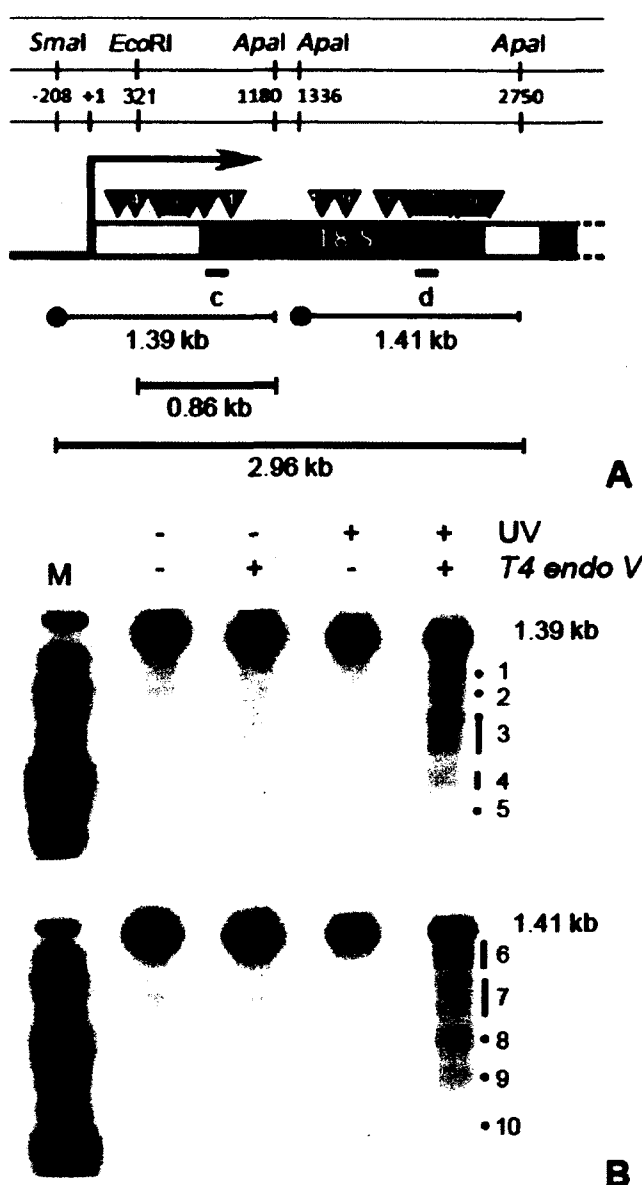


Figure 1: Average CPD yields, and hotspots for CPD formation, downstream of the rDNA transcription initiation site. (A) Map of the 18S portion of the rDNA gene. The 5'-end and direction of transcription are shown, together with the restriction sites and their positions from the transcription initiation site (+1). The labels 1 to 10 mark the 10 hotspot-regions for CPD formation detected downstream of the 5'-end (see B). The labels 'c' and 'd' represent 2 of the amplicons used in the ChIP assay (Fig. 2), and are shown here as references. The black circles represent the two 25 nucleotides long oligomers, that are complementary to the transcribed strand (TS), used for indirect end-labeling for the *Sma*I-*Apa*I and *Apa*I-*Apa*I fragments; the first nucleotide of the sequence corresponding to the positions -208 (*Sma*I site) and +1336 (*Apa*I site), respectively. (B) DNA was isolated from cells that were harvested before (-UV) or soon after (+UV) irradiation, digested with *Sma*I and *Apa*I and mock treated or treated with *T4 endo V* (denoted by - and +, respectively). Upper panel: indirect end labeling for the proximal 1.39 kb *Sma*I-*Apa*I fragment; lower panel: indirect end labeling for the distal 1.41 kb *Apa*I-*Apa*I fragment. Size marker (M): 1.5, 1.2, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 and 0.1 kb. Labels 1 to 10 denote the hotspots for CPD formation.

Presence of CPDs correlates with dissociation of RNAPI.

To determine the fate of RNAPI on damaged rDNA the occupancy of RNAPI was mapped throughout the rDNA-coding sequence: before irradiation, soon after, and during repair. Chromatin-immunoprecipitation (ChIP) on formaldehyde crosslinked cells was performed with IgG coated beads that bind the TAP tag, and real time amplification of co-precipitated DNA was done as detailed in methods, using a series of amplicons that span the rDNA unit (Fig 2A). The data obtained for each immuno-precipitation and plotted as percent of input are shown in figure 2B. In *WT* cells, drop in RNAPI occupancy was observed in the central and 3'- portions of rRNA genes, between 0.5 and 1 hour after irradiation (*WT*; amplicons-e, -f, -g). After 2 hours there was ~50% recovery and at 4 hours most of the RNAPI occupancy was restored. A different result was found for the *rad14Δ* cells where CPDs are not removed from the rDNA locus. In this NER deficient mutant, most RNAPI definitively dissociated from the central and 3'-terminal portions of the coding region (*rad14Δ*; amplicons-d, -e, -f, -g). Conversely, in both *WT* and *rad14Δ* cells RNAPI were present, or even accumulated (about 1.5 to 2 times), in the DNA contiguous to the 5'-end and throughout the incubation time (*WT*; amplicons-c, -d and *rad14Δ*; amplicon-c). The amplicon-a, which is outside of the rDNA coding region, was used as control. Therefore, the DNA region spanning the start of transcription and the likely position of the first CPD was densely packed with RNAPI. On the contrary, RNAPI were absent in the central and 3' terminal DNA regions, likely beyond the first CPD. The latter condition becomes significant ~2.96 kb downstream of the transcription start site (around amplicon-d; see also Fig 1), since in this region most of the rRNA genes (~87.3%) have at least 1 CPD in the TS.

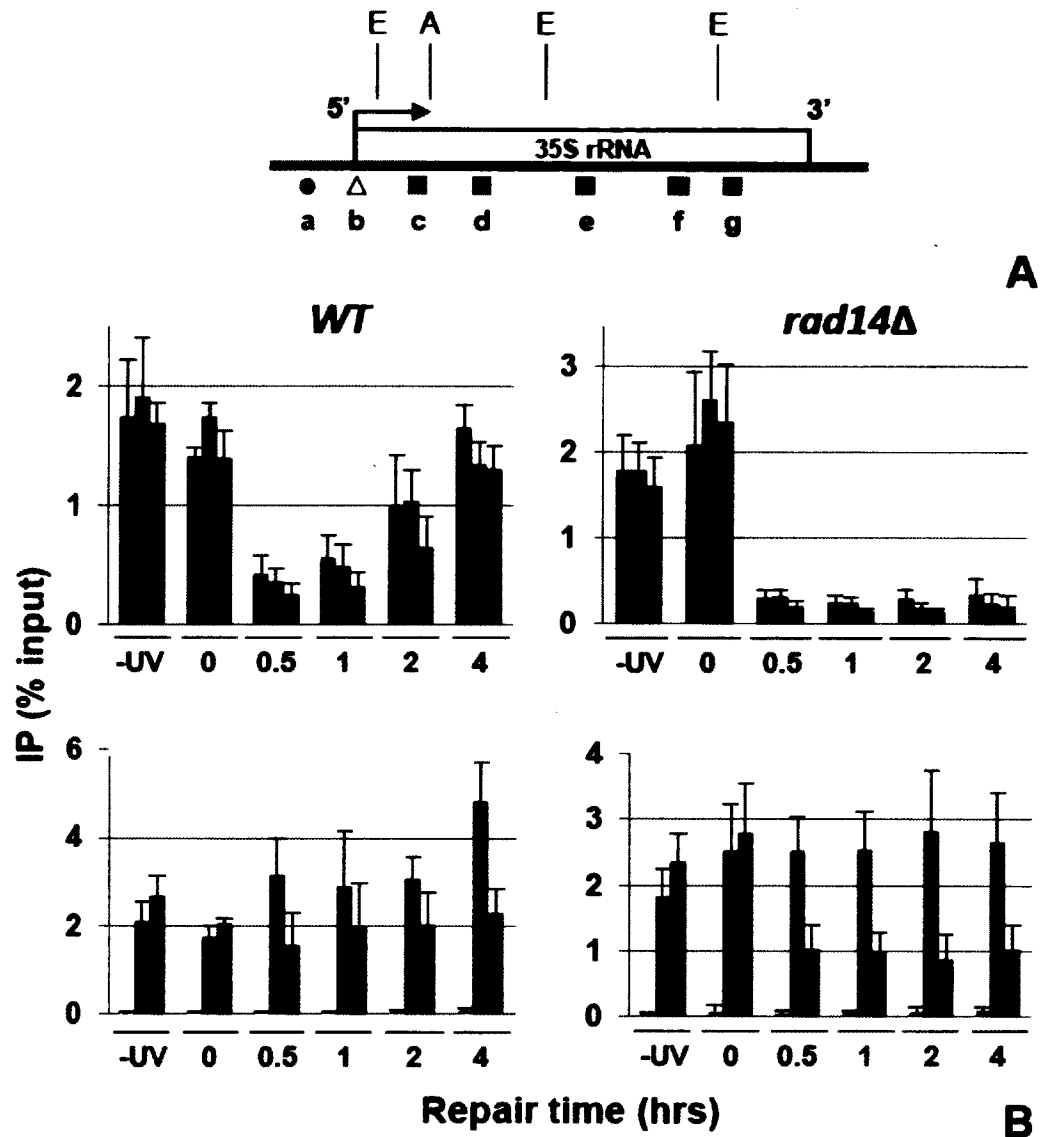


Figure 2: Dissociation of RNAPII from UV damaged rRNA gene TS. (A) Map of the yeast 35S rRNA gene; the 5'- and 3'-end are shown together with the direction of transcription (arrow). The letters 'a' to 'g' position the amplicons (average length of ~150 bp) synthesized in real-time polymerase chain reaction; 'b' is the amplicon used for the experiment described in figure 3C. (B) Chromatin immuno-precipitation. Upper panel: data obtained for amplicons 'e', 'f' and 'g'. Lower panel: data obtained for amplicons 'a' (control), 'c' and 'd'. Data are the means \pm 1 SD of 4 independent biological experiments. They represent the percent of input of total cellular extract for the respective DNA fragment that co-precipitated with the indicated TAP-tagged fusion protein.

RNAPI stability and pre-initiation complex formation in UV irradiated cells.

It was reported that when DNA lesions persist stalled RNAPII are removed from DNA damage sites by proteolytic degradation (Woudstra et al., 2002). The results presented here showed displacement of RNAPI in the central and 3' terminal rDNA regions but continuous association of RNAPI within the rDNA 5'-end region, in both *WT* and *rad14Δ* cells (Fig 2). Hence, to determine if there was significant degradation of RNAPI, the content of RNAPI was followed for each experimental time point. The *rad14Δ* cells were employed since RNAPI degradation, if any, would be more prominent in this strain than in the *WT*, due to the persistence of CPDs and, consequently, global arrest of RNAPII transcription. Total cellular proteins were extracted from *rad14Δ* cells before UV treatment, soon after and at different incubation times. After separation on SDS-PAGE and transfer to filter membrane, detection of TAP tagged Rpa190 (largest RNAPI subunit) using rabbit polyclonal antibodies were done as described in methods (Fig 3A, upper panel; UV). Signals in each lane were quantified and normalized to the signal for -UV (lower panel; black bars). As control for the investigation on the stability of RNAPI before and after UV irradiation, cells were irradiated in the presence of cycloheximide (UV + CHX; white bars) or treated with the inhibitor of protein synthesis alone (CHX; gray bars). The data show that the half-life stability of RNAPI is shorter after UV irradiation and that the amount of RNAPI gradually decreased to ~15% after 4 hours incubation. Thus, the results indicate that stalled RNAPI at DNA lesions could be removed by proteolytic degradation. Considering that: there are ~150 copies of rRNA genes, ~35% of them are active, there are ~15000 RNAPI (Bier, Fath, & Tschochner, 2004), there is one RNAPI every ~130 bp (French et al., 2003) and that the coding region is 6.86 kb long, ~2800 RNAPI are engaged in transcription under normal growth conditions. After UV irradiation most of the rRNA genes have at least one CPD in the first 2.9 kb region, which can fit at most ~1200 RNAPI (~22 RNAPI multiplied by ~52 rRNA genes). This is an over estimation since it is based on the assumption that CPDs mostly form towards the end of the 2.9 kb fragment. However, CPDs form almost randomly over the fragment and, consequently, a number of genes will have less than ~22 RNAPI. In *rad14Δ* cells at 4 hours after irradiation, the content of RNAPI is ~15% of the original amount, or ~2250 molecules. Hence, measurements of the

remaining pool of RNAPI after UV irradiation are in agreement with the data obtained by ChIP (Fig 2B).

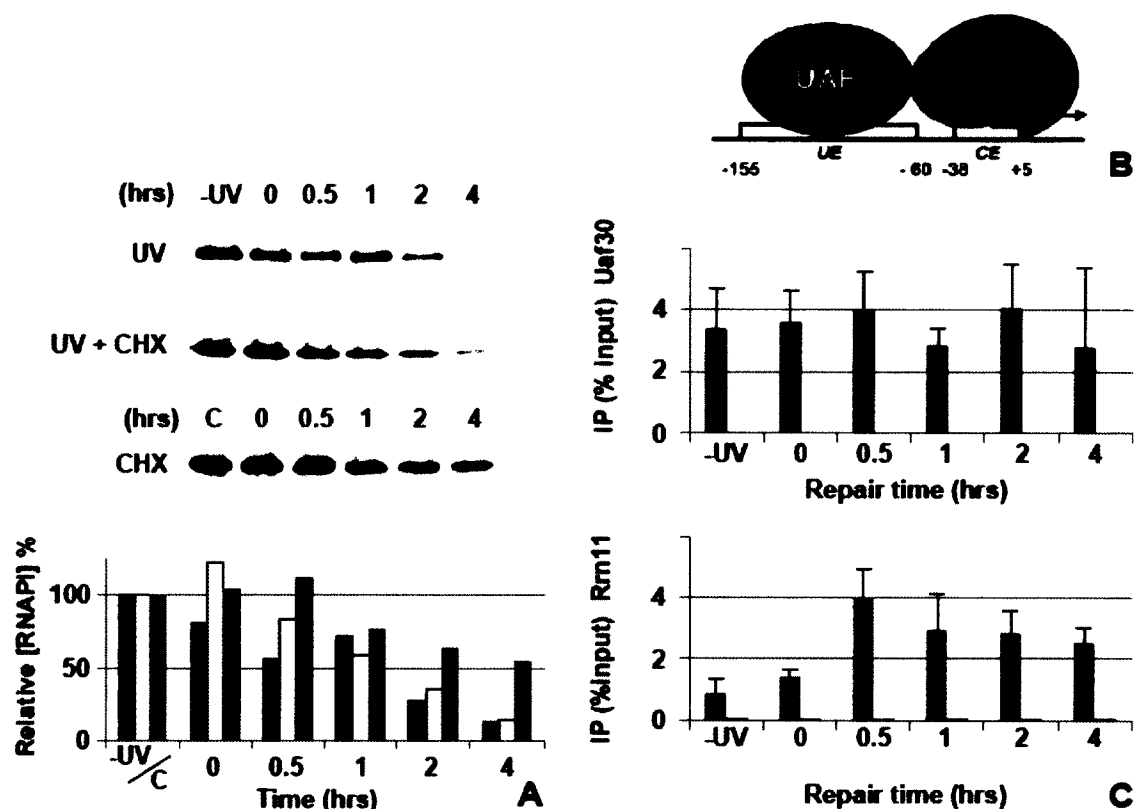


Figure 3: Stability of RNAPI and RNAPI pre-initiation complex after UV irradiation. (A) Upper panel: total yeast proteins were isolated from *rad14Δ* cells before irradiation (-UV) and at different times thereafter (0, 0.5, 1, 2 and 4h) in absence or presence of cycloheximide (UV and UV + CHX, respectively). CHX was added to a final concentration of 100μg/ml immediately after UV irradiation. In parallel, CHX was added to non-irradiated cells (CHX) that were collected at the same time points (C: control, mock treated cells). After separation by SDS-PAGE and electro-blotting, the filter membranes were first stained with Ponceau red to control for equal loading and then incubated with antibodies against protein A to detect the TAP tagged Rpa190 subunit of RNAPI. Lower panel: data were quantified using ImageQuantNT software and the signals normalized to the non-irradiated samples for UV (black bars) and UV + CHX (white bars). For CHX treated cells (gray bars) signals were normalized to the mock treated cells (C). (B) The rDNA promoter includes the UE (upstream element) and CE (core element). The UAF (upstream activating factor), CF (core factor) and their DNaseI footprinting positions (-155 to -60 and -38 to +5) (Bordi, Cioci, & Camilloni, 2001; Vogelauer, Cioci, & Camilloni, 1998) are shown, together with direction of transcription (arrow). (C) Chromatin immuno-precipitation using the antibody against HA to target HA tagged Uaf30 and HA tagged Rm11. Amplicon 'b' (Fig 2A) was used to synthesize a fragment of 113 bp by real-time polymerase chain reaction and amplicon 'e' was used as control, giving values between 0.02 and 0.04 IP (% input), only slightly visible in the histogram. Data are the means \pm 1 SD of 4 independent biological experiments and represent the percent of the input of total cellular extract for the respective DNA fragment co-precipitating with the indicated HA-tagged fusion protein.

In yeast, rDNA transcription is largely regulated by the initiation rate (Fahy et al., 2005; French et al., 2003), namely by the binding of UAF (formed by Uaf30, Rrn5, Rrn9, Rrn10, H3 and H4) and CF (formed by Rrn6, Rrn7 and Rrn11) to the promoter (Fig 3B) (Meier & Thoma, 2005; Ness, Labhart, Banz, Koller, & Parish, 1983). To confirm the presence of the RNAPI pre-initiation complex after UV irradiation, the amount of HA tagged UAF and CF on the rDNA promoter of *WT* cells was followed by ChIP using IgG coated beads. The real time amplification of co-precipitated DNA was done as detailed in methods, using amplicon-b in the promoter and amplicon-e as control (Fig 2A). The data obtained for each immuno-precipitation and plotted as percent of input are shown in figure 3C. The amount of UAF was similar before UV irradiation and throughout the repair times (upper panel), whereas the amount of CF increased ~3 times, on average, after irradiation (lower panel). Increase in binding of CF at the rDNA promoter closely corroborates the ~1.5-2 times increase in RNAPI at the 5'-end after UV irradiation (Fig 2B).

Arrangements of rDNA/RNAPI/rRNA ternary complexes during NER.

The results described in figure 2 correlate the presence of CPDs in the TS of the rDNA coding region with dissociation of RNAPI, and the repair of CPDs with anew association of RNAPI. However, they do not provide information on the existence of the ternary complex rDNA/RNAPI/rRNA during NER. Miller's chromatin spreading onto electron microscopy grids, followed by visual analysis, provides direct view of rDNA transcription and rRNA processing (Osheim et al., 2008). Therefore, electron microscopy was used to visualize the ternary complexes (Fig 4A) and to measure their lengths during NER, in *WT* and in *rad14Δ* cells (Fig 4B); single measurements of transcription units are shown in Fig S1 (note to the readers: size and amount of data is too big to fit in this thesis, refer to the paper's publisher website for these EM images). Before irradiation (-UV), micrographs obtained from both strains depicted the characteristic Christmas tree-like transcription units. For the *WT*, after 0.5 hours repair micrographs showed a mixed population of short transcription units, the lengths of which gradually increased as repair proceeded (1 to 4 h). For the *rad14Δ*, the micrographs showed short transcription units throughout the entire incubation time and

full-length units were not found. Already after 0.5 hours the transcription units in *WT* cells were, on average, longer than those observed in *rad14Δ* cells (Fig 4B), reflecting the efficiency of NER in the *WT*. Consistent with the results obtained by ChIP of RNAPI, the chromatin spreads showed that for *WT* the recovery of full length ternary complexes was almost complete after 4 hours repair. In addition, in both strains the ternary complexes were detectable at the estimated rDNA 5'- region throughout the incubation time after UV irradiation.

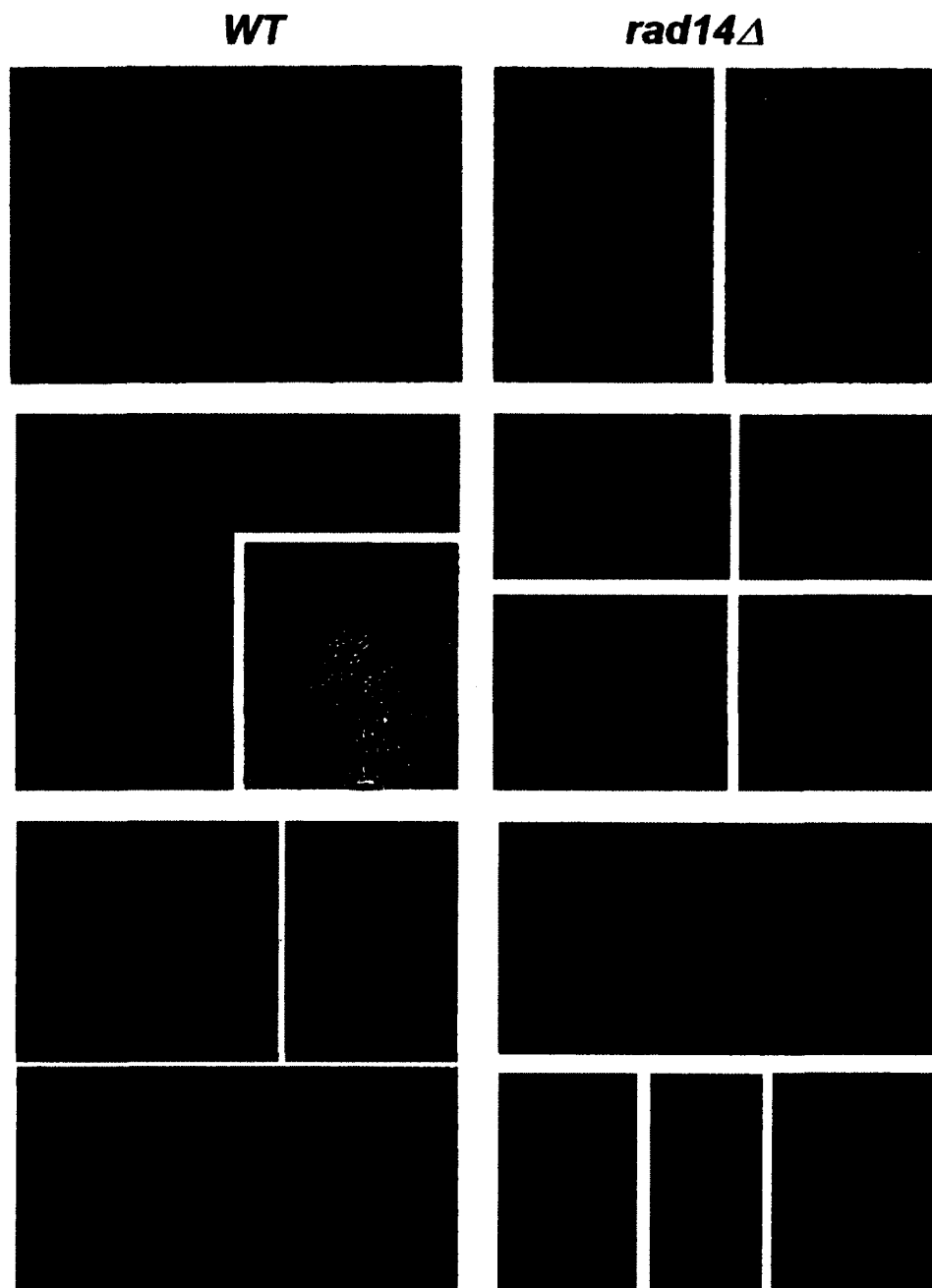
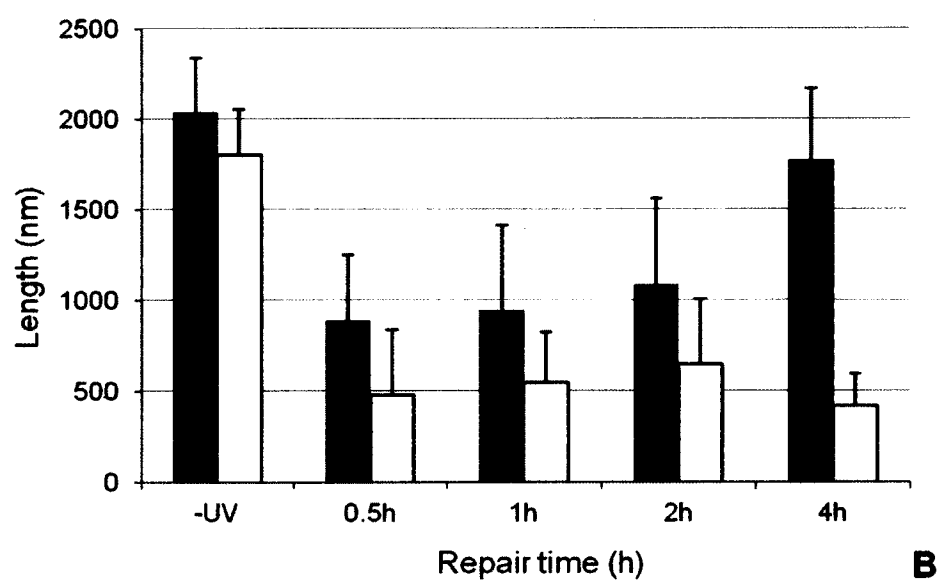
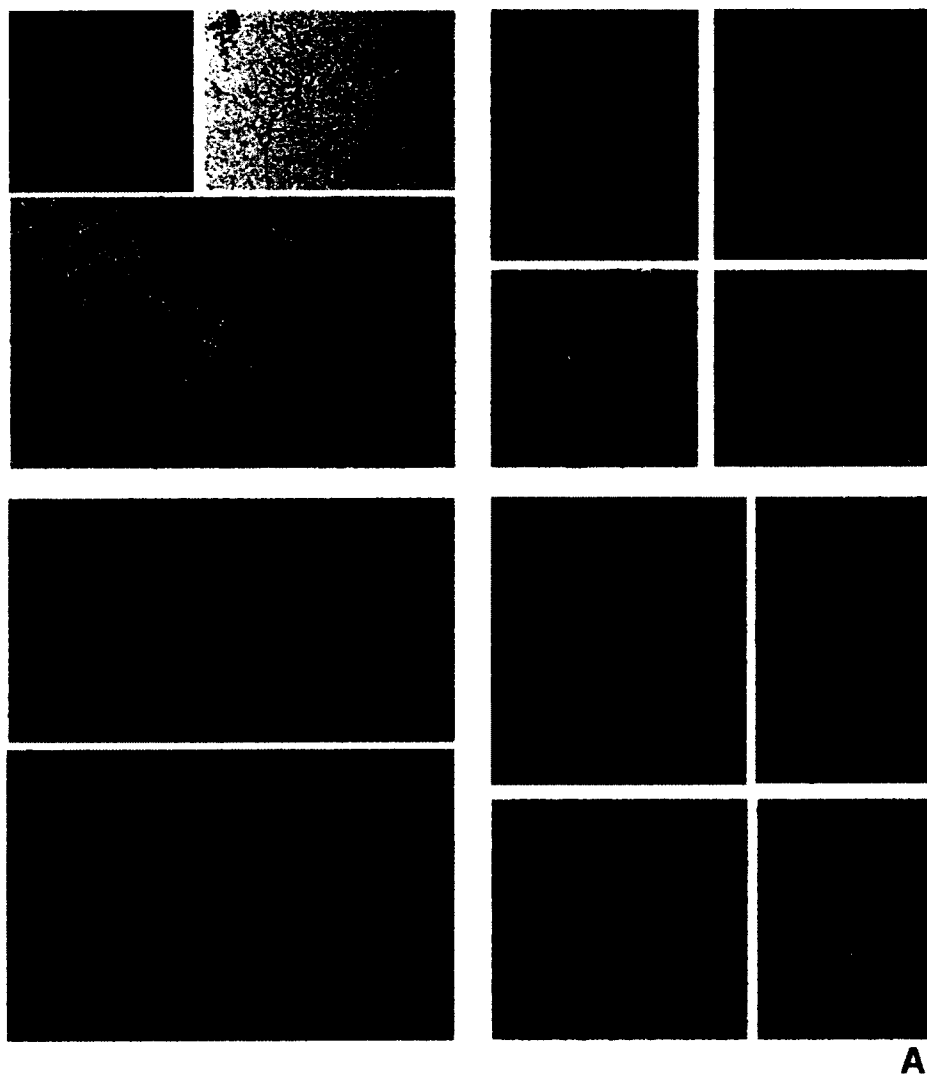


Figure 4: Electron micrographs of rRNA genes taken at different times after UV irradiation. (A) Log phase cells before irradiation (- UV), and at different times during repair (0.5 to 4 hours, see next page for 2h and 4h data) were prepared for Miller chromatin spreads. Left panel: *WT* and right panel: *rad14Δ*. (B – next page) After visualization of the rDNA transcription units, their lengths were measured by tracing the transcription units with ImageJ software. The measured lengths were compared to the internal standard lengths of 100 and 500 nm. The data were obtained from different preparations of chromatin spreads and the number of transcription units analyzed for each sample of the *WT* were: -UV, 33; 0.5h, 18; 1h, 29; 2h, 23; 4h, 22, and of *rad14Δ* were: -UV, 30; 0.5h, 11; 1h, 32; 2h, 24; 4h, 9. All the transcription units that were measured are shown in figure S1 (refer to the paper's website for figures as there is too much data to fit in this thesis). The histogram shows the average lengths (in nm) with standard errors (SE). *WT*; gray columns and *rad14Δ*; white columns.



RNAPI associated with the 5'-end are transcription competent.

The data obtained by ChIP in combination with electron microscopy suggested that RNAPI elongated from the promoter to the first DNA lesion on the TS, where they paused and then released from the DNA. To test if the ternary complexes observed in chromatin spreads were not stalled but indeed elongating, the transcription run-on (or TRO) assay was applied. TRO uses isolated nuclei and, therefore, endogenous chromatin as template for transcription. Since nuclei are incubated under conditions that permit transcription elongation of the many RNA polymerases that were engaged in transcribing RNA prior to nuclei isolation (Carey, Smale, & Peterson, 2009), the RNAPI activity measured by TRO reflected its activity in intact cells, before and after UV irradiation and during NER. Four different rDNA fragments, spanning the entire rRNA gene (Fig 5A), were spotted onto filter membranes and hybridized with radio-labeled RNA obtained from nuclei that were incubated in TRO reaction conditions (Figs 5B and C, left panels). Quantifications of signals (right panels) showed that before UV irradiation (-UV) and soon after (0 h), in *WT* and *rad14Δ*, RNAPI elongation (or rRNA production) was similar at the 5'-end, in the middle and at the 3'-end of the gene. That is; the TRO ratios between rDNA fragment 2 and rDNA fragment 3 or rDNA fragment 4 gave values that were near to 1 (e.g. for -UV; *WT*: 0.7 ± 0.2 ; 0.9 ± 0.3 and *rad14Δ*: 0.9 ± 0.2 ; 1.1 ± 0.3 for the 5'-end to middle and 5'-end to 3'-end ratios, respectively). These results indicate that before irradiation RNAPI were distributed throughout the rDNA locus. On the contrary, after 0.5 hours ~3.8 times more rRNA was produced at the 5'-end than in the middle of the gene, and considerably more rRNA was produced at the 5'-end than at the 3'-end. Measurements for the *WT* showed that the TRO ratios gradually returned to ~1 after 4 hours incubation, whereas measurements of RNAPI elongation for the *rad14Δ* remained higher at the 5'-end than in the middle and at the 3'-end of the gene, for the entire incubation time. Already after 0.5 hours incubation, the 5'-end to 3'-end ratios were smaller for the *WT* than for the *rad14Δ* strain, which reflected the DNA repair kinetics (Conconi et al., 2005), and corroborate the differences in average lengths of the ternary complexes (Fig 4B). The results imply that RNAPI molecules, that were associated between the rDNA 5'-end and the likely position of

the first CPD, were transcription competent.

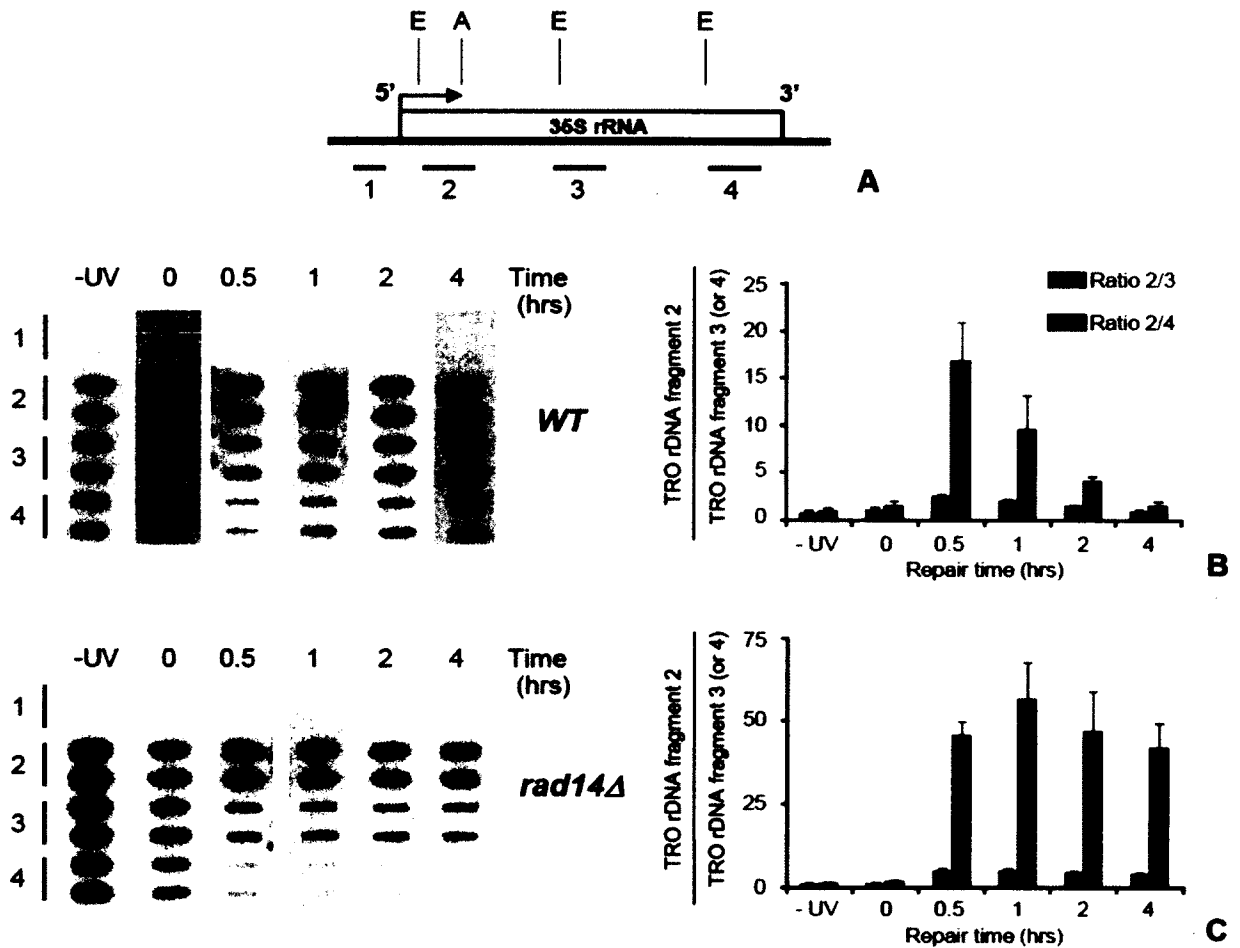
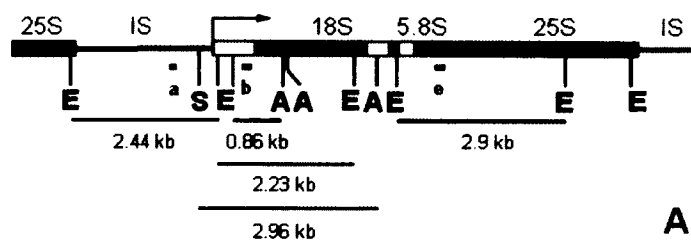


Figure 5: Measurements of RNAPII elongation in WT and *rad14Δ* cells during NER, at the 5'-end, in the middle and at the 3'-end of rRNA gene. (A) Map of the yeast 35S rRNA gene; the 5'- and 3'-end, together with the direction of transcription (arrow), are shown. The restriction sites *EcoRI* (E) and *ApaI* (A) are shown as references for comparison with figures 1, 2 and 6. The bars 1 to 4 position the rDNA fragments synthesized by polymerase chain reaction (1; 532 bp, 2 to 4; average length of ~950 bp). (B) Nuclei were isolated from non-irradiated (-UV) and from irradiated WT cells at different repair times (0, 0.5, 1, 2 and 4h). Left panel: after incubation of isolated nuclei in TRO reaction conditions, and in the presence of [α - 32 P]UTP, the purified elongated and radio-labeled RNAs were used as probes to hybridize the membrane-bound rDNA fragments (1 to 4), that were spotted in duplicate onto filter membranes. Fragment 1 was used as control for hybridization specificity. Right panel: membranes were exposed to phosphorimager screens and the signals were quantified by ImageQuant software. The histogram shows measurements for the 5'-end (rDNA-fragment 2) that were either normalized to the corresponding measurements for the middle (rDNA-fragment 3, gray bars) or for the 3'-end (rDNA-fragment 4, black bars). Data are the means \pm 1 SD of three independent biological experiments. (C) Same experiments as described in (B) were done for the *rad14Δ* cells.

Changes in rDNA chromatin conformations after UV irradiation.

Psoralen crosslinking was used to monitor changes in rDNA chromatin structure during NER. This technique allows determining the proportion of open vs. closed rRNA gene chromatin. Namely, open rDNA chromatin binds more psoralen than closed rDNA chromatin, and purified psoralen crosslinked DNA from the former fraction migrates slower in native agarose gel electrophoresis than psoralen crosslinked DNA isolated from the latter fraction (reviewed in Sogo & Thoma, 2003; Toussaint *et al.*, 2005). Cells were collected before UV irradiation, soon after and during repair. Thereafter, nuclei were isolated and treated with psoralen. Following DNA purification and restriction enzyme digestion, the fragmented DNA was separated by gel electrophoresis and blotted. Changes in rDNA chromatin during NER were measured in the central portion and at the 5'-end of the gene (Fig 6A; E-E, 2.9 kb and E-A, 0.86 kb, respectively). Before UV irradiation and immediately after, rRNA genes were separated into open and closed copies (Figs 6B and 6C, -UV and 0; a- and i- band, respectively). For the central portion of rDNA, and during the first hour after irradiation, changes in psoralen accessibility indicated gradual closing of active rRNA genes (E-E; disappearance of the a-band), at 2 hours there was some recovery of the active copies and at 4 hours an even higher percentage of open rRNA genes than before UV irradiation was restored (Fig 6C; E-E, 4hrs) (see below). During the same repair times the 5'-end region largely retained the open chromatin structure, although some chromatin rearrangement occurred since ~37.9% of rRNA genes had at least 1 CPD in the 0.86 kb *EcoRI-ApaI* fragment, which promoted block of RNAPI and chromatin inactivation (Fig 6C; E-A, 0.5hrs). Analyses at the 5'-end also showed additional opening of rRNA genes at 4 hours after irradiation (Fig 6C; E-A, 4hrs). Since the short 0.86 kb fragment incorporated less psoralen crosslinks than the long 2.9 kb fragment, the separation of the a- and i-bands was less defined for the 0.86 kb fragment than for the 2.9 kb fragment (Fig 6C, -UV; compare E-E and E-A). Our previous studies on NER and chromatin rearrangement in the rDNA locus were done using the *JS311* strain and its isogenic NER deficient mutants (Conconi *et al.*, 2002, 2005), which has a higher proportion of active rRNA genes than the strain used in this study. As control psoralen crosslinking was applied in parallel to the *JS311 WT* and *rad14Δ* strains. The results show that changes in the proportion of the two

forms of rDNA chromatin during NER were similar for both *WT* strains (Fig S2A), and that in *rad14Δ* there was no reopening of rRNA genes after irradiation (Fig S2B). This set of experiments points out that the presence of CPDs coincided with fall off of RNAPI from the TS and inactivation of rDNA chromatin. In addition, the region contiguous to the 5'-end that did not contain CPDs (~62.1% of the rRNA genes) was continuously engaged in transcription and retained an open chromatin structure.

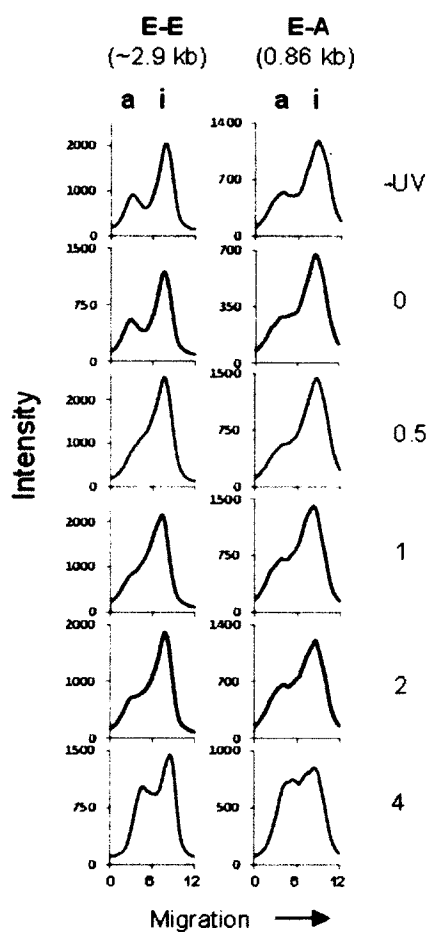


A

-UV 0 0.5 1 2 4 Time (hrs)



B



C

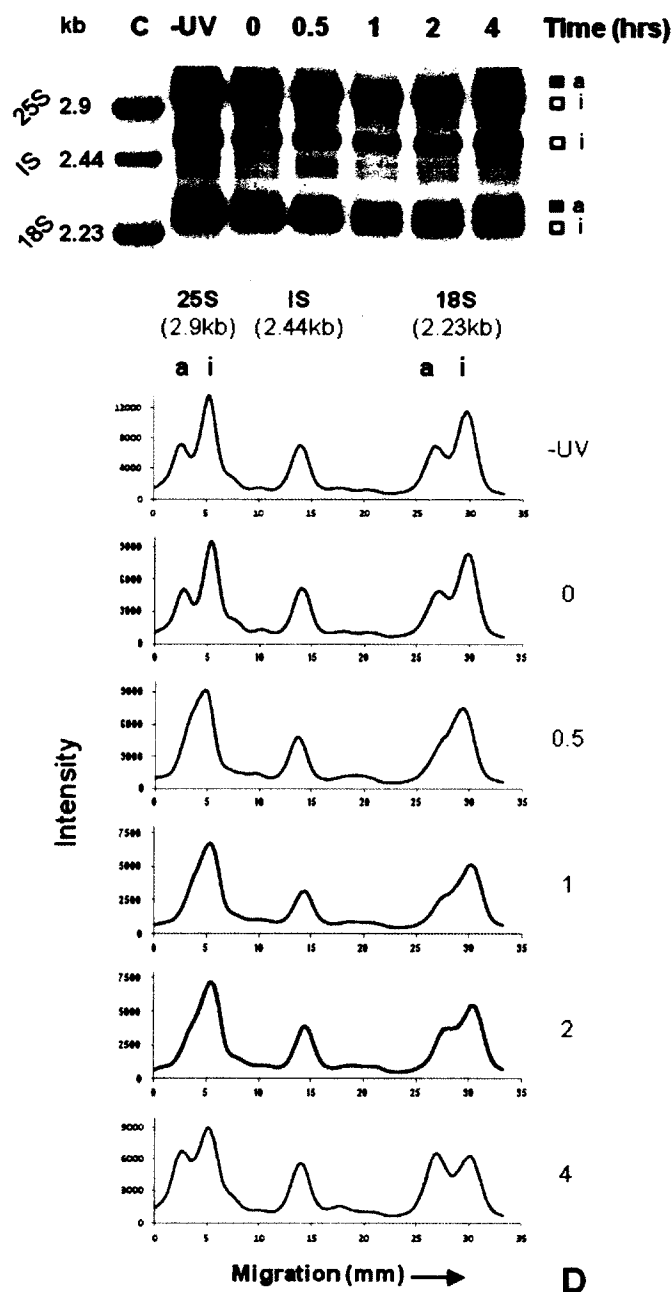


Figure 6: Chromatin structure of rRNA genes during NER. (A – previous page) Map of the yeast 35S rRNA gene; IS, 18S, 5.8S and 25S are the intergenic spacer and the three regions of the coding portion of rDNA. The ‘a’, ‘c’ and ‘e’ represent the probes (and amplicons in Fig 2), E (*EcoRI*), S (*SmaI*) and A (*ApaI*). (B – previous page) Nuclei isolated from cells that were collected before UV irradiation (-UV), soon after (0) and at different repair times (0.5, 1, 2 and 4 h), were cross-linked with psoralen. DNA was extracted, digested with the respective restriction enzymes and separated on 1% native agarose gels. After blotting, the filter membranes were hybridized with ^{32}P end-labeled oligonucleotide ‘e’ or ‘b’; a: active and i: inactive rDNA chromatin. (C – previous page) Scan profiles of the gels shown in (B). (D) Upper panel: DNA was extracted from non-crosslinked (control, C) and psoralen crosslinked nuclei (-UV to 4h), digested with *EcoRI*, separated on 1% native agarose gels and blotted. The filter membranes were hybridized with the combination of ^{32}P end-labeled oligonucleotides ‘a’, ‘c’ and ‘e’. Lower panel: scan profiles of the gel shown.

After 4 hours repair, more than the original percent of open rRNA genes was restored. Since DNA lesions halt the progression of the replication fork (Rudolph, Upton, & Lloyd, 2007), we followed the distribution of cells at different times after UV irradiation to determine if a partial arrest in G1/S could explain the increase in percent of open rRNA genes. In fact, it was recently shown that most of the rRNA genes assumed an open chromatin conformation when DNA replication was prevented and cells were arrested in the G1-phase of the cell cycle by α -factor (Wittner et al., 2011). The results shown in figure S3 indicate that indeed at 4 hours after irradiation there was partial accumulation of cells in G1/S. As control, the dynamic of rDNA chromatin in cells that were synchronized in G1 by addition of α -factor were also analyzed by psoralen crosslinking.

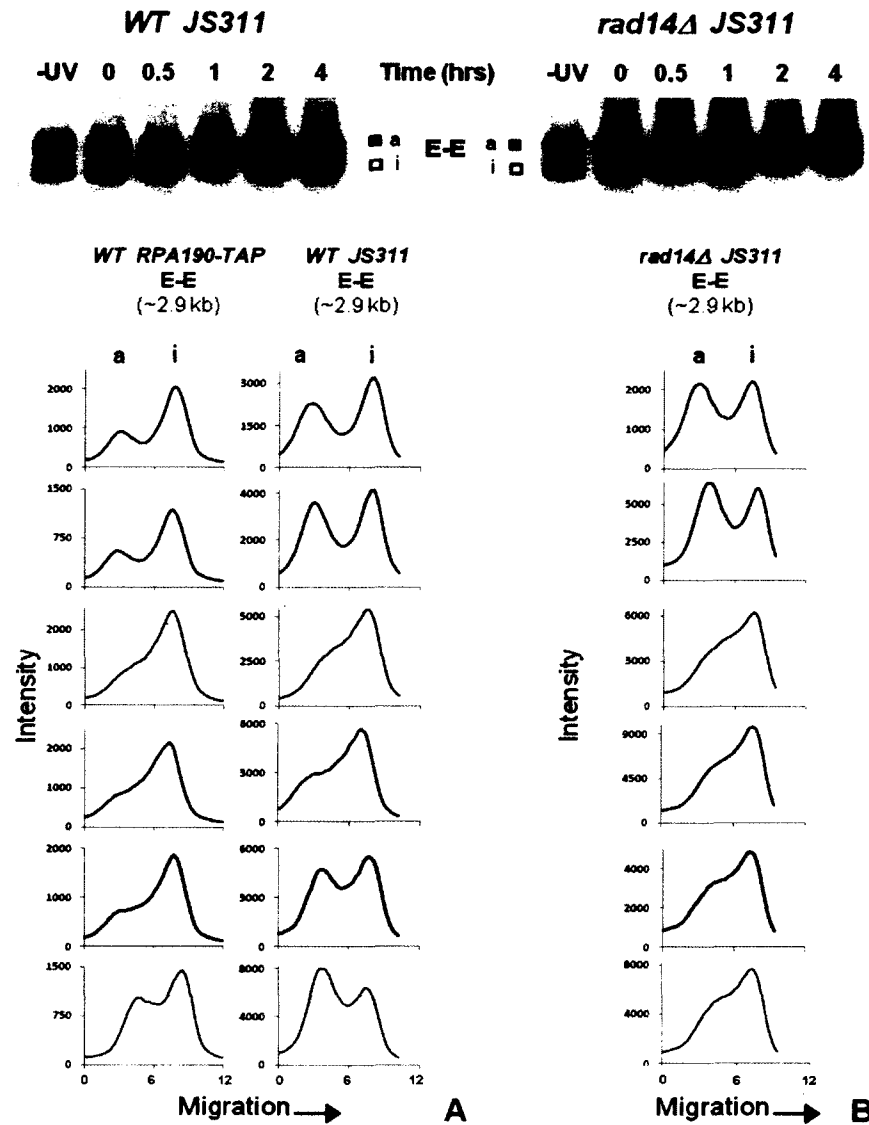


Figure S2: Related to figure 6: changes of rRNA genes in chromatin after UV irradiation in the *WT* (*RAD*⁺) *JS311* and *rad14Δ* isogenic strain. UV irradiation, nuclei isolation and psoralen crosslinking were done as described in figure 6. Symbols are: E-E is the ~2.9 kb *EcoRI* fragment; “a” stays for active and “i” for inactive rDNA fractions. (A) *WT*; scan profiles for *RPA190-TAP* are shown again for comparison. The results show that changes in the proportion of the two forms of rDNA chromatin during NER were similar for both, the yeast strain carrying the *RPA190-TAP* tagged and the *JS311*. However, the original fraction of active rRNA genes was restored somewhat faster in *JS311* than in the *RPA190-TAP* strain (compare scan profiles). In addition, in the *JS311* strain there are more active rRNA genes than in the *RPA190-TAP* strain [compare -UV, active (a) vs. inactive (i)]. We note that the proportion of active vs. inactive rDNA varies with the size of the rDNA array, which is strain dependent (French et al., 2003). The presence of a higher copy number of active rRNA genes in *JS311* could explain, at least in part, the relatively faster recovery of active rDNA chromatin in this strain than in the *RPA190-TAP* strain. Like for the *RPA190-TAP* strain, in *JS311* more open rRNA genes were restored after 4 hours repair. (B) *rad14Δ JS311*; in *JS311 RAD*⁺ the original fraction of active rRNA genes was restored between 2 and 4 hours after irradiation, whereas no restoration of active rRNA genes was observed in the *rad14Δ* strain.

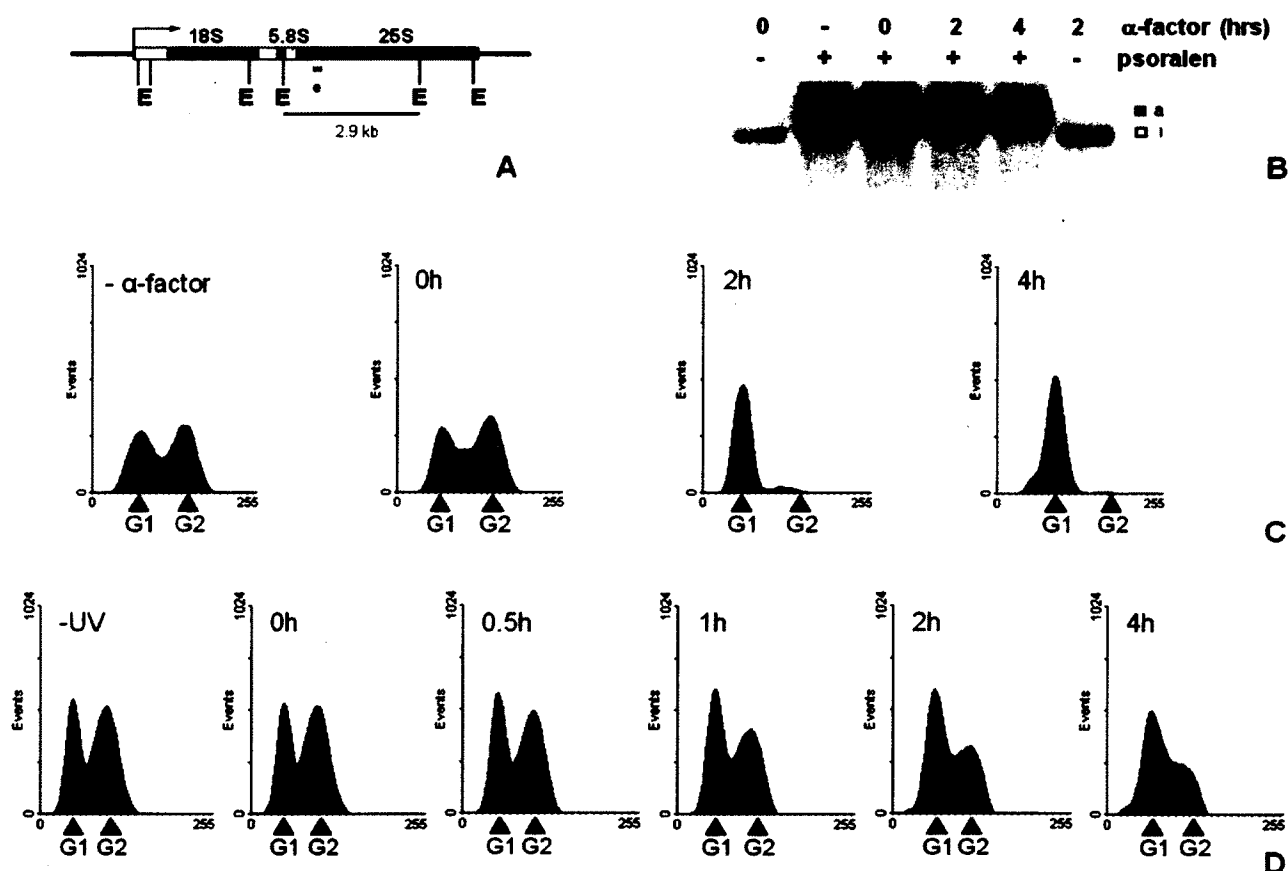


Figure S3: Opening of rRNA genes in G1 arrested cells. (A) Map of the yeast 35S rRNA gene with the 18S, 5.8S and 25S coding regions. The probe 'e' (amplicon in Fig 2) and the *Eco*RI restriction site (E) are shown. (B) Nuclei were isolated from aliquots of cells (Tab. S1; JS306-A190MN-*bar1Δ*) that were mock treated (- α-factor) or treated with α-factor and then collected at different incubation times (0, 2 and 4 h). After psoralen crosslinking DNA was extracted, digested with *Eco*RI and separated on 1% native agarose gels. After blotting, the filter membranes were hybridized with ³²P end-labeled oligonucleotide 'e'; a: active and i: inactive rDNA chromatin. (C) In parallel, cell aliquots were prepared for Flow Cytometry. The results show that most of the rRNA genes opened when cells arrested in G1 [compare figures (B) and (C)]. (D) Cells (JS311), non-irradiated (-UV) or UV irradiated (0 h), were incubated for different repair times (0.5 to 4 h), and prepared for Flow Cytometry. The results show that at 4 h there was some accumulation of cells arrested in G, and they explain the additional opening of rRNA genes after 4 h repair (Figs 6 and S2A).

Reactivation of rDNA chromatin starts at the 5'- end.

Psoralen crosslinking was also applied to compare the rearrangement of rDNA chromatin during NER in 3 different *EcoRI* fragments of similar sizes (Fig 6A): the 2.44 kb E-E fragment comprising the entire intergenic spacer (IS) between rRNA genes, which is covered by nucleosomes; the 2.23 kb E-E fragment containing most of the 18S region; and the 2.9 kb E-E fragment containing a large portion of the 25S region. UV irradiation of *WT* cells, psoralen crosslinking and DNA analyses by agarose gel electrophoresis were done as described above. Filter membranes were hybridized with the three end-labelled oligonucleotides 'a', 'c' and 'e' simultaneously and the results are shown in figure 6D. Samples of DNA isolated from uncrosslinked nuclei that were used as controls (upper panel; C) showed the three E-E fragments corresponding to the 25S, IS and 18S regions. After psoralen treatment the same rDNA fragments showed the characteristic slow migration caused by psoralen crosslinking (-UV) (Dammann et al., 1993; Ness et al., 1983). As expected, the doublet of bands (open and closed rDNA chromatin) was observed for the 25S and 18S rRNA coding fragments but not for the IS fragment. Moreover, changes in rDNA chromatin during NER were observed for the coding regions only, and were as described in figures 6B and 6C (E-E fragment). In addition, the data showed that opening of rDNA chromatin was faster in the 18S than in the 25S region (lower panel). These results suggest that after removal of CPDs, opening of rDNA chromatin is re-established starting at the 5'-end and sequentially expanding to the downstream portion of the gene. Again, after 4 hours there was higher percentage of open rRNA genes than observed before UV irradiation.

Occurrence of RNAPI dissociation and nucleosomes deposition.

ChIP could not be used to characterize the composition of open and closed rDNA (e.g.; presence, or absence, of histone and other proteins) since the coexistence of two distinct rDNA chromatin populations limits the interpretation of the data obtained by immunoprecipitation. Namely, determining the amount of histones associated with the rDNA locus is compromised because the results represent only an average of active- and inactive-rDNA

copies. Psoralen crosslinking and chromatin endogenous cleavage (ChEC) were combined to overcome the limitation of ChIP for rDNA chromatin (Merz et al., 2008). ChEC is a very sensitive assay for assessing the presence and position of DNA binding proteins *in vivo* (Schmid, Durussel, & Laemmli, 2004). It is based on tagging the C-termini of endogenous proteins with micrococcal nuclease. The nuclease is inoperative since the concentration of Ca^{2+} in yeast cytoplasm and nucleus is low (50-200nM). Upon exogenous addition of Ca^{2+} the micrococcal nuclease is activated and a double strands break is introduced within ~100 to 200 bp of the DNA binding site of the tagged protein. Thereafter, mapping the double strand breaks determines the position of the tagged protein on the DNA. To partially characterize the composition of rDNA chromatin during NER, namely the a-band, i-band and the smear between the two rDNA populations, psoralen crosslinking and ChEC were combined.

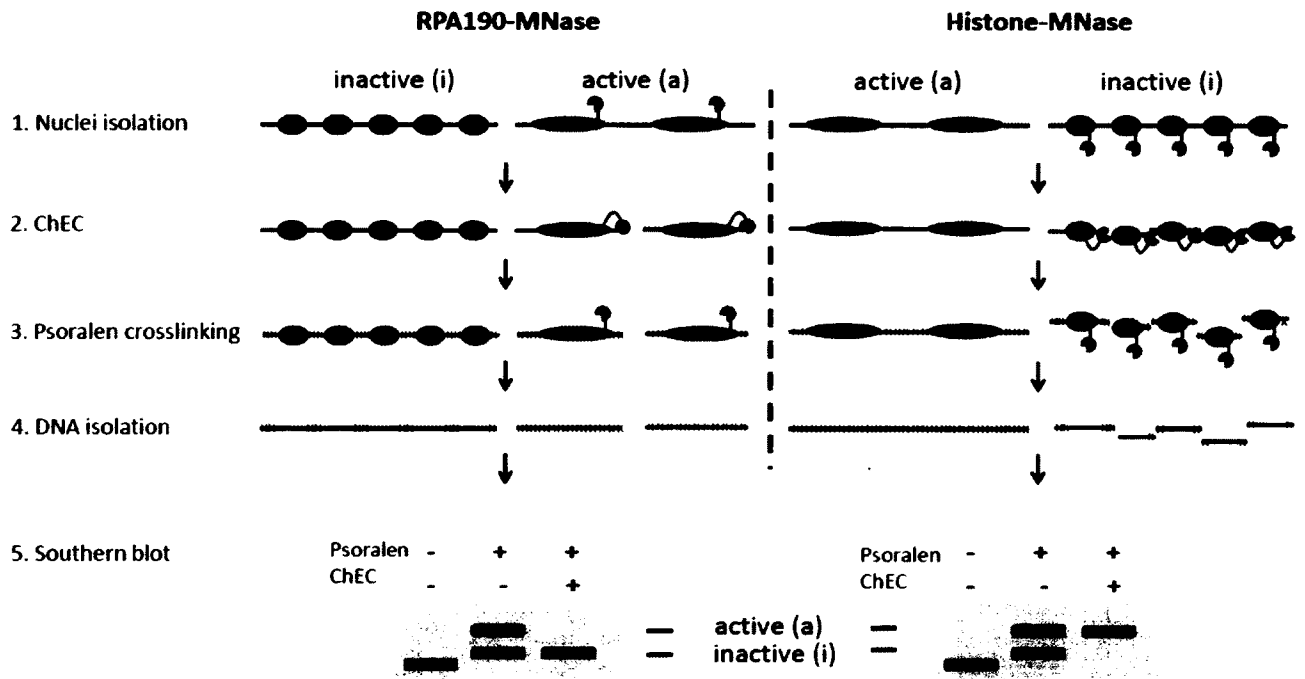


Figure S4: Schematic representation of the combined ChEC and psoralen crosslinking. Green and red ovals represent RNAPI and nucleosomes, respectively; the orange semicircles represent micrococcal nuclease (MNase) tags. The purple crosses represent psoralen crosslinks, “a” stays for active and “i” for inactive rDNA chromatin. Left: MNase is fused to a subunit of RNAPI (component of the a-band), and right MNase is fused to a histone protein (component of the i-band). 1: Nuclei are isolated from yeast expressing single MNase fused proteins and, 2: incubated in the presence of Ca^{2+} to induce cleavage (ChEC). Thereafter, 3: nuclei are photo-crosslinked with psoralen and, 5: the DNA is isolated and digested with the appropriate restriction enzymes, separated by agarose gel electrophoresis and, 6: analyzed by Southern blot. The examples show

three-lanes filter membranes representing the control (no ChEC, no psoralen crosslinking), separation of active and inactive rDNA by psoralen crosslinking (no ChEC), and analysis of rDNA protein content by ChEC for active (left) and inactive rDNA (right).

The induction of micrococcal nuclease caused selective degradation (or decrease in signal intensity) of the rDNA population that contained the tagged protein (for additional explanation see Fig S4). *WT* cells carrying micrococcal nuclease-tagged RNAPI subunit 190 or Hmo1 (components of active rRNA genes) and histone H2A or H3 (components of inactive rRNA genes), were mock treated or treated with UV light. Nuclei were isolated, Ca^{2+} was added to induce micrococcal nuclease cleavage and incubated for different times. DNA cleavage was stopped and the nuclei were crosslinked with psoralen, DNA was isolated, digested with *EcoRI* (Fig 6A 18S and 25S; 2.23 and 2.9 kbp fragments, respectively) and analyzed by agarose gel electrophoresis. The results for a single time point of the micrococcal nuclease digestion are presented in figure 7 and the whole time courses in figure S5. Like for untagged (Conconi et al., 2005) (Fig S2A) and TAP-tagged yeast strains (Fig 6), rRNA genes in yeast carrying micrococcal nuclease tagged proteins, before UV irradiation and immediately after, were separated into active and inactive copies (0 min ChEC, -UV and 0h). During the first hour after irradiation, changes in psoralen accessibility indicated a gradual, although not complete, closing of the active rRNA genes (25S: 0 min ChEC, 0.5 and 1h; 18S: 0.5h). For the 25S region, reopening occurred 2 hours after irradiation (25S: 0 min ChEC, 2h). For the 18S region reopening of rRNA genes occurred already 1 hour after irradiation, again implying that reopening of chromatin started in the 18S region (18S: 0 min ChEC, 1h). After activation of micrococcal nuclease tagged to A190 and Hmo1 proteins (Figs 7A and B, respectively), before and after irradiation (-UV, 0h) the a-band was mostly degraded (compare 0 and 30 min ChEC), indicating that RNAPI and Hmo1 are components of the active rRNA genes chromatin. Moreover, the smear between the a- and i-bands (25S: 0.5 and 1h; 18S: 0.5h) was also degraded implying that the two markers for active rRNA genes were present in this rDNA subpopulation. After re-opening of rRNA genes, only the a-band was degraded (25S: 2 and 4h; 18S: 1 to 4h). After activation of the micrococcus nuclease tagged to H2A and H3 proteins (Figs 7C and D, respectively), before and after irradiation (-UV, 0h) the i-band was mostly degraded (compare 0 and 2 min), indicating that nucleosomes were components of

the inactive rRNA genes chromatin. The smear between the a- and i-bands (25S: 0.5 and 1h; 18S: 0.5h) was degraded, together with the i-band. The results suggest that the subpopulation of rDNA chromatin, migrating between the inactive and active rRNA genes chromatin, was partially composed of RNAPI, HmoI and nucleosomes. In parallel, the same set of proteins was tagged in the NER deficient *rad14Δ* cells. The results for a single time point of the micrococcal nuclease digestion are presented in figure 8 and the whole time courses in figure S6. Like for untagged *rad14Δ* strains (Conconi et al., 2005) (Fig S2B), rRNA genes in yeast carrying micrococcal nuclease tagged proteins, before UV irradiation and immediately after, were separated into active and inactive copies (0 min ChEC, -UV and 0h). After irradiation, the a-band changed into a smear but, in contrast to *WT*, there was no re-opening of rRNA gene chromatin even after 4 h incubation (0 min ChEC, 0.5 to 4h). Upon activation of micrococcal nuclease tagged to A190 and HmoI proteins (Figs 8A and B, 30 min), or to H2A and H3 proteins (Figs 8C and D, 2 min), before and after irradiation (-UV, 0h), mostly the a-band, or the i-band were degraded, respectively. Similarly to *WT*, the smear between the a- and i-bands contained both markers for active (Figs 8A and 8B; 30 min ChEC, 0.5 to 4h) and inactive (Figs 8C and 8D; 2 min ChEC, 0.5 to 4h) rRNA genes. However, upon activation of micrococcal nuclease tagged to A190 and HmoI the degradation of the smeary signal was considerably slower than upon activation of micrococcal nuclease tagged to H2A and H3 (Figs S6, 0.5h to 4h). Also, signals for the a-bands were more resistant to histones tagged-micrococcal nuclease in the 18S than in the 25S, again indicating that after UV irradiation replacement of RNAPI and HmoI by nucleosomes occurred predominantly downstream of the likely position of the first CPD.

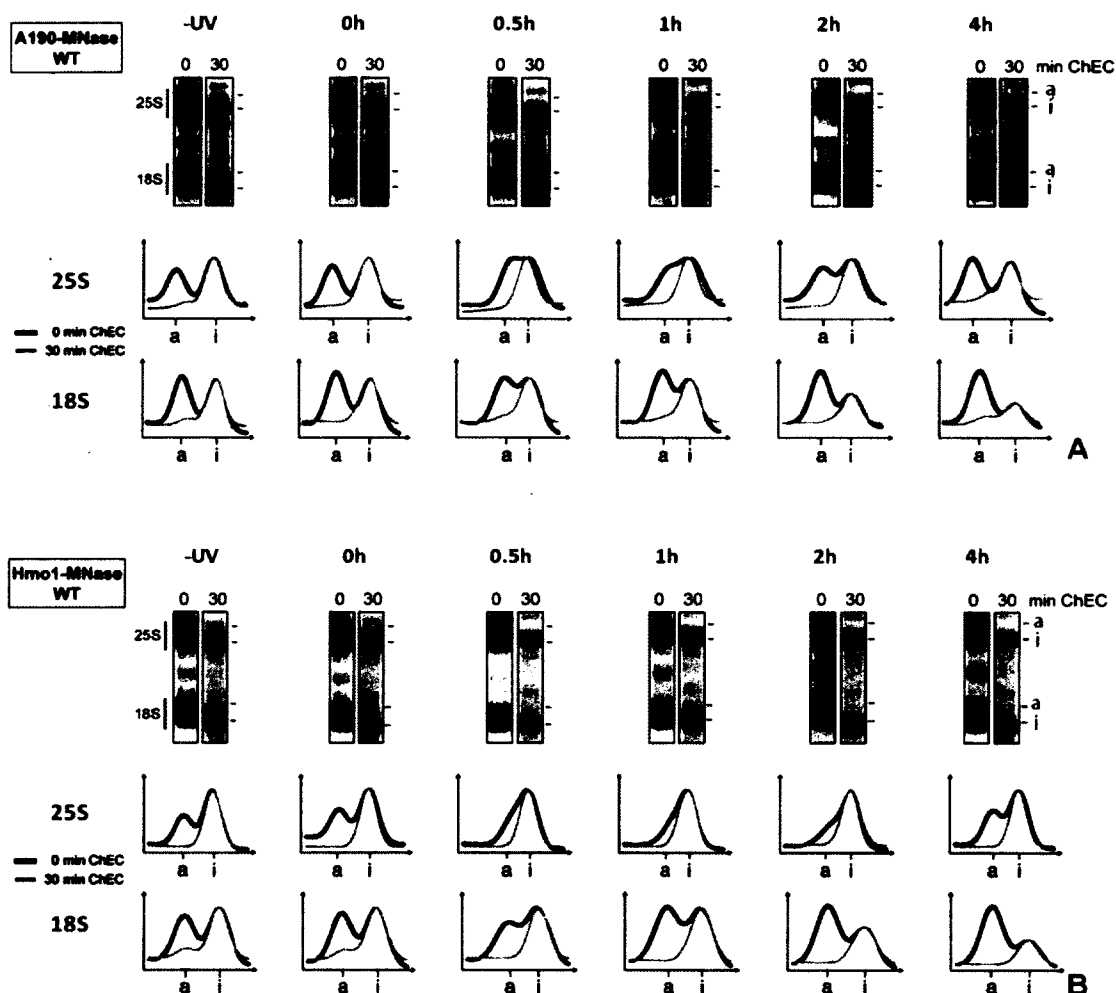


Figure 7: Closing and re-opening of rRNA genes chromatin resulted from nucleosomes loading and unloading. Yeast *WT* for NER and expressing the RNAPI subunit A190-, Hmo1-, H2A- or H3- micrococcal nuclease fusion proteins, non-irradiated (-UV) or UV irradiated (0h), were incubated for different times to allow repair (0.5 to 4h). Nuclei were isolated and ChEC was initiated by adding CaCl_2 to the nuclei suspensions. DNA cleavage was allowed to proceed for various times as indicated by 'min ChEC' (Fig S5), where '0' is the control (CaCl_2 mock treated). Only 30 and 2 min nuclease digestions are shown in A, B and C, D respectively. After addition of EDTA containing buffer to stop the nuclease activity, psoralen crosslinking, DNA extraction and *EcoRI* restriction enzyme digestion (Fig 6A), the DNA samples were separated on 1% native agarose gels and blotted to filter membranes that were probed to detect the 2.23 and 2.9 kbp *EcoRI* fragments, containing portions of the 18S and 25S regions, respectively. Upper panels are for: (A) A190- (B) Hmo1- (C – next page) H2A- (D – next page) H3- micrococcal nuclease fused protein. Symbols are: "a" for active and "i" for inactive rDNA chromatin. Lower panels are the scan profiles of gels shown in the corresponding upper panels. To directly compare the signals, the intensities of the corresponding bands were equalized and normalized.

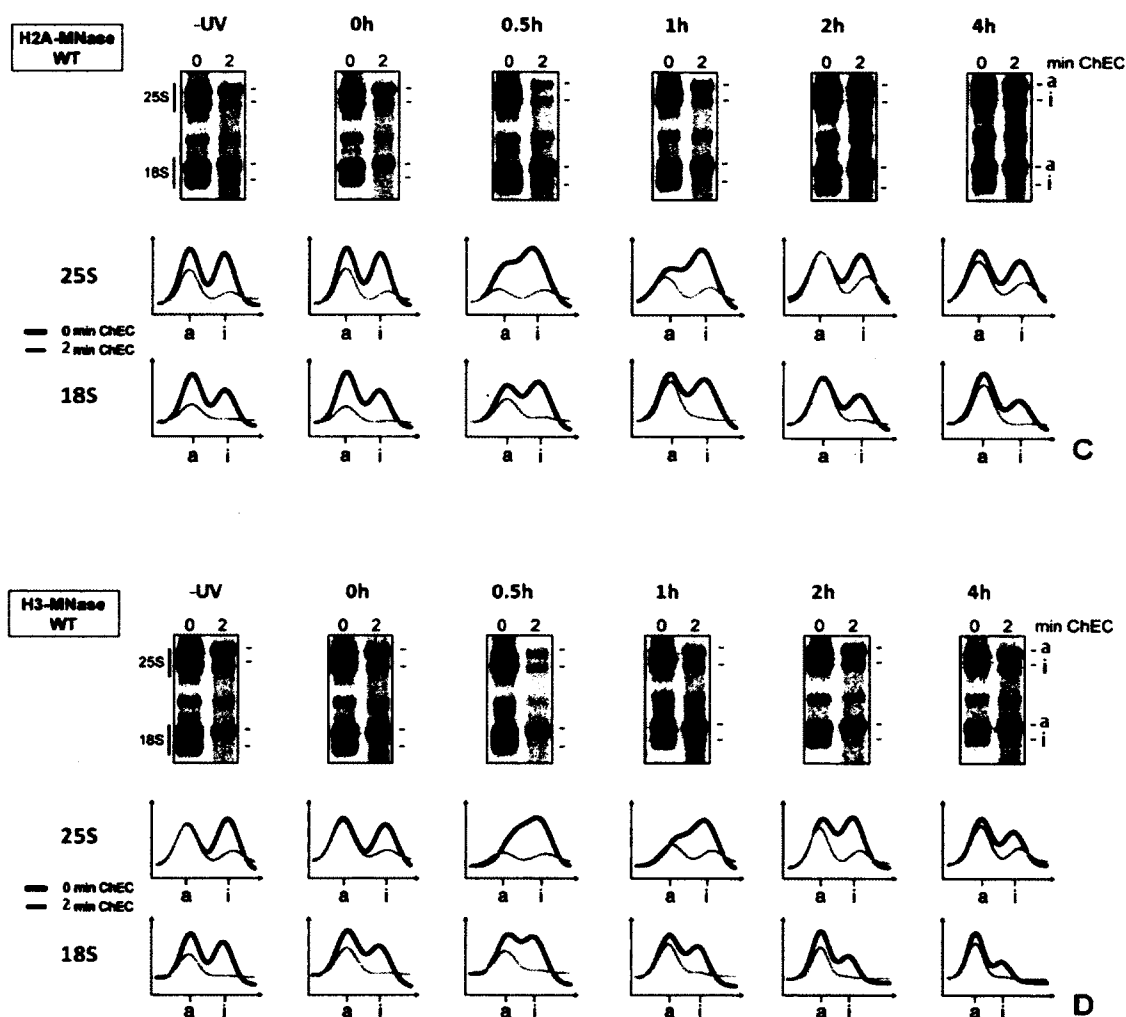


Figure 7: Closing and re-opening of rRNA genes chromatin resulted from nucleosomes loading and unloading. Yeast *WT* for NER and expressing the RNAPI subunit A190-, Hmo1-, H2A- or H3- micrococcal nuclease fusion proteins, non-irradiated (-UV) or UV irradiated (0h), were incubated for different times to allow repair (0.5 to 4h). Nuclei were isolated and ChEC was initiated by adding CaCl_2 to the nuclei suspensions. DNA cleavage was allowed to proceed for various times as indicated by 'min ChEC' (Fig S5), where '0' is the control (CaCl_2 mock treated). Only 30 and 2 min nuclease digestions are shown in A, B and C, D respectively. After addition of EDTA containing buffer to stop the nuclease activity, psoralen crosslinking, DNA extraction and *EcoRI* restriction enzyme digestion (Fig 6A), the DNA samples were separated on 1% native agarose gels and blotted to filter membranes that were probed to detect the 2.23 and 2.9 kbp *EcoRI* fragments, containing portions of the 18S and 25S regions, respectively. Upper panels are for: (A – previous page) A190- (B – previous page) Hmo1- (C) H2A- (D) H3- micrococcal nuclease fused protein. Symbols are: "a" for active and "i" for inactive rDNA chromatin. Lower panels are the scan profiles of gels shown in the corresponding upper panels. To directly compare the signals, the intensities of the corresponding bands were equalized and normalized.

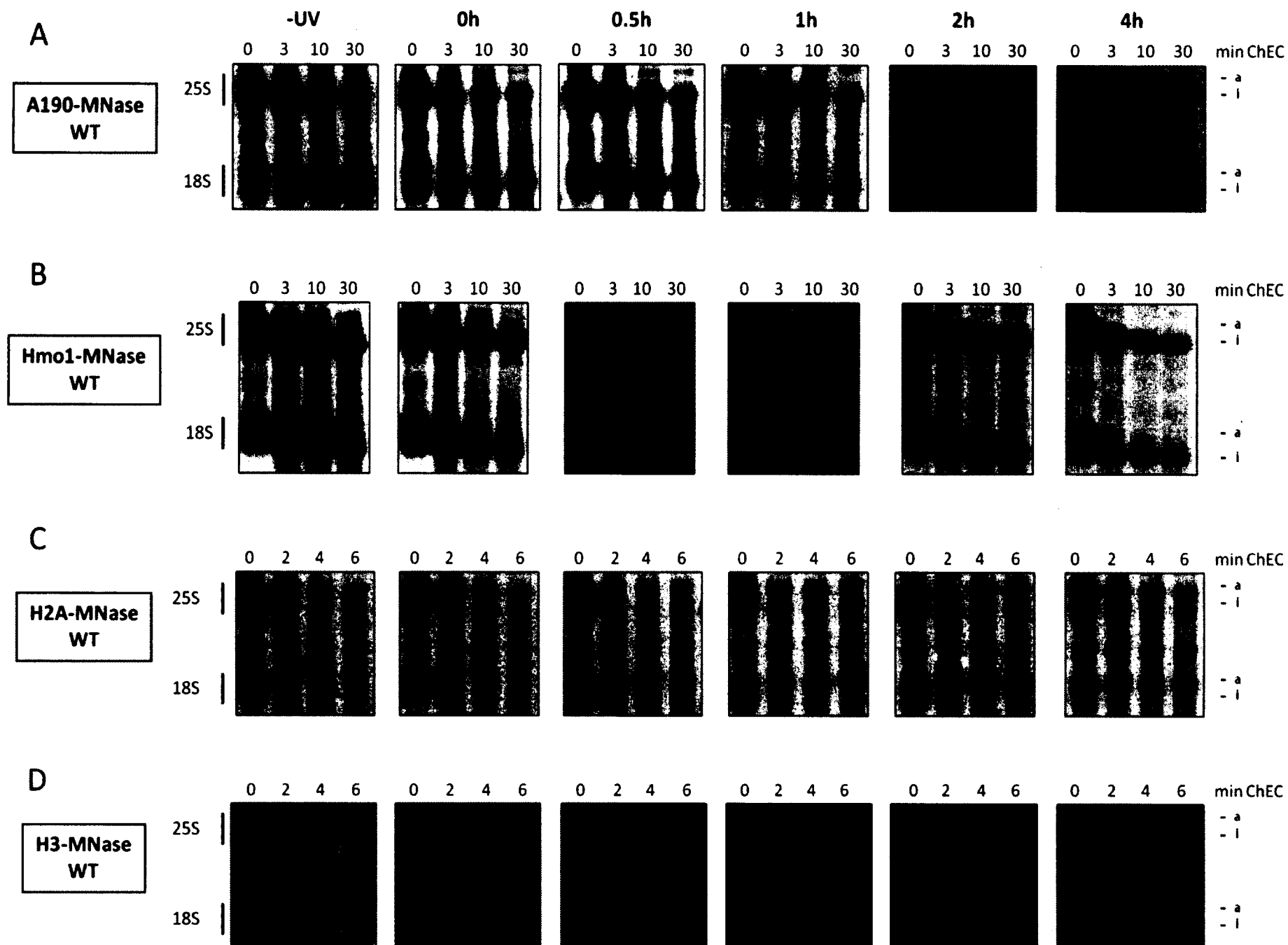
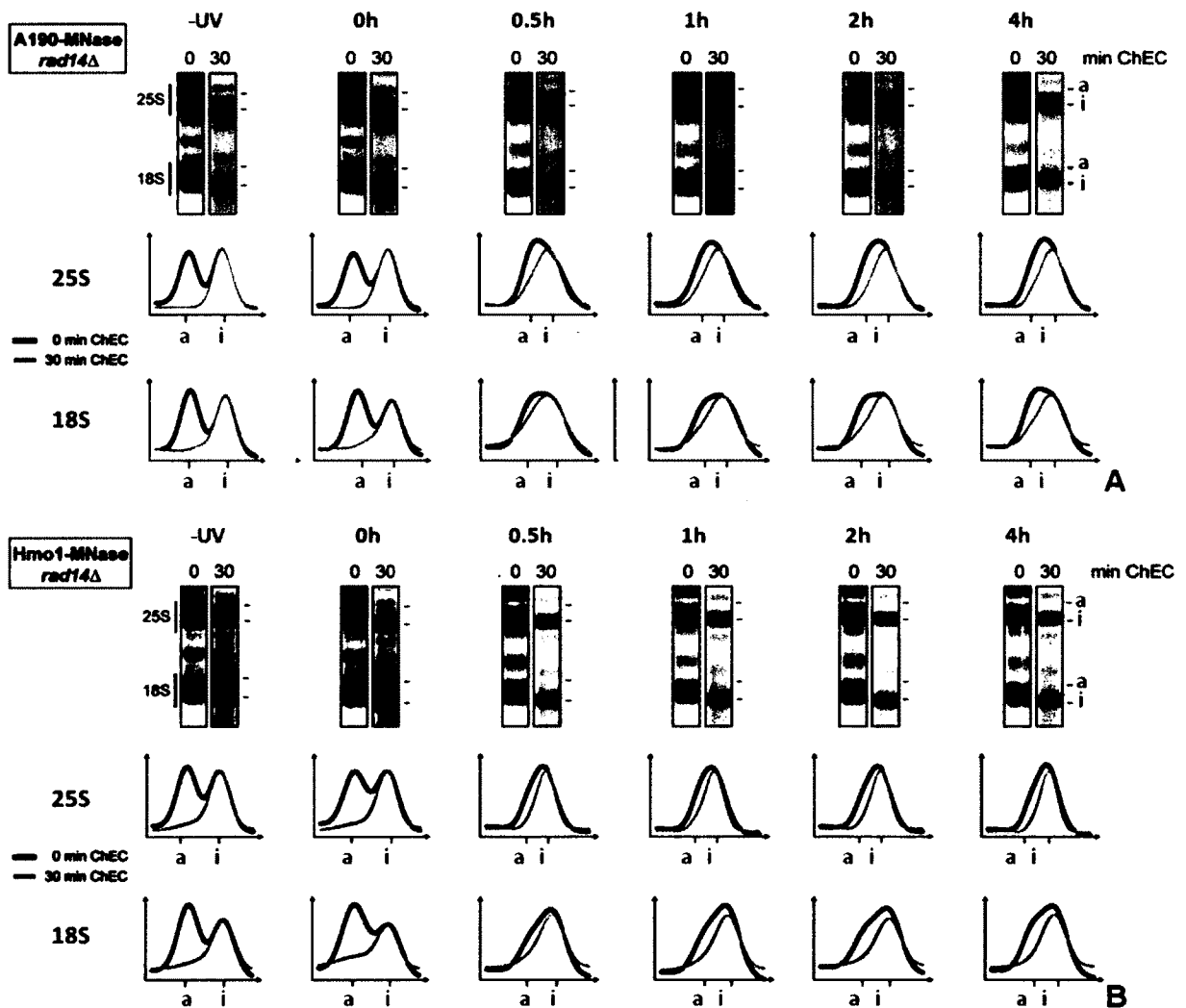


Figure S5: Closing and re-opening of rRNA genes chromatin resulted from nucleosomes loading and unloading. Yeast *WT* for NER and expressing the RNAPI subunit A190-, Hmo1-, H2A- or H3- micrococcal nuclease fusion proteins, non-irradiated (-UV) or UV irradiated (0h), were incubated for different times to allow repair (0.5 to 4h). Nuclei were isolated and ChEC was initiated by adding CaCl_2 to the nuclei suspensions. DNA cleavage was allowed to proceed for various times as indicated by 'min ChEC', where '0' is the control (CaCl_2 mock treated). After addition of EDTA containing buffer to stop the nuclease activity, psoralen crosslinking, DNA extraction and *Eco*RI restriction enzyme digestion (Fig 6A), the DNA samples were separated on 1% native agarose gels and blotted to filter membranes that were probed to detect the 2.23 and 2.9 kbp *Eco*RI fragments containing portions of the 18S and 25S regions, respectively. Symbols are: "a" for active and "i" for inactive rDNA chromatin.



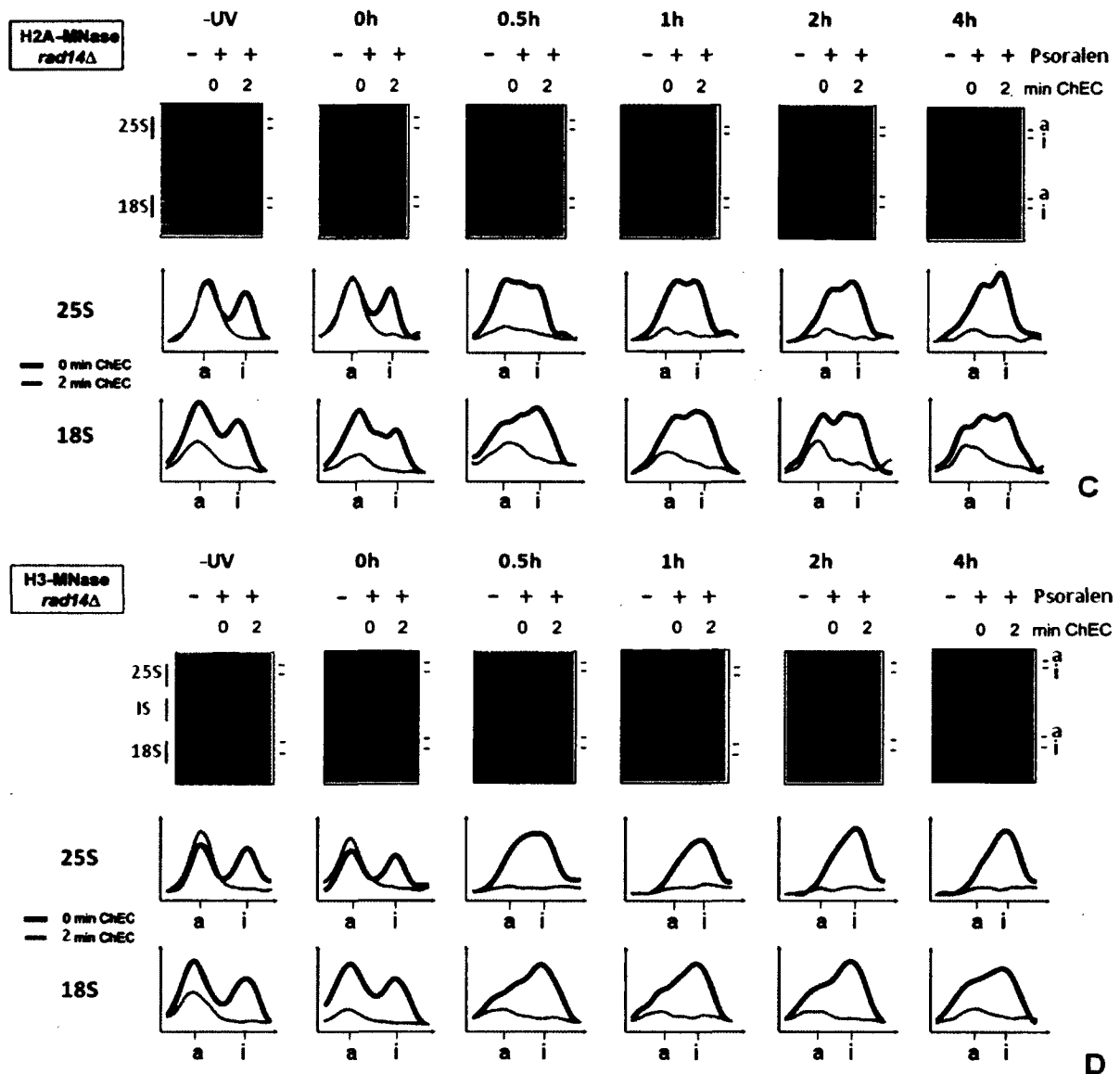


Figure 8: Closing of rRNA genes chromatin in *rad14Δ* cells after UV irradiation resulted from nucleosomes loading. Yeast *rad14Δ* expressing the RNAPI subunit A190-, Hmo1-, H2A- or H3- micrococcal nuclease fusion proteins, non-irradiated (-UV) or UV irradiated (0h), were incubated for different times (0.5 to 4h). ChEC and DNA analyses were done as described in figure 7 and the entire micrococcal nuclease time courses are shown in figure S9. Labeling in A to D (A and B – previous page) is as described in the legend of figure 7. In addition, the a control lane for psoralen crosslinking (- Psoralen) was added in (C) and (D), and in figure D the filter membranes were hybridized with the same combination of probes used for the experiment shown in figure 6D to detect simultaneously the restriction fragments corresponding to the 25S, 15S and 18S.

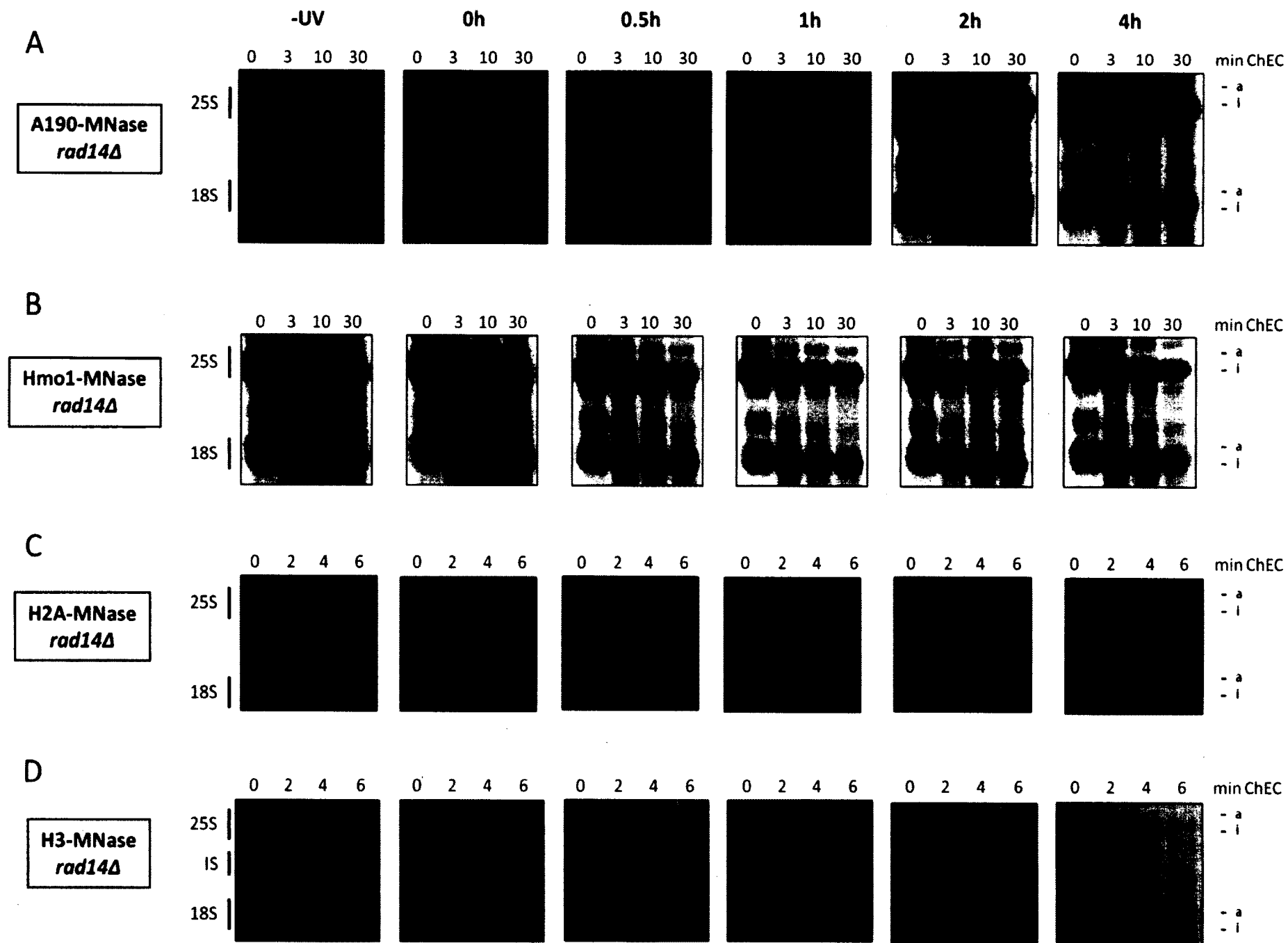


Figure S6: Closing of rRNA genes chromatin in *rad14Δ* cells after UV irradiation resulted from nucleosomes loading. Yeast *rad14Δ* expressing the RNAPI subunit A190-, Hmo1-, H2A- or H3- micrococcal nuclease fusion proteins, non-irradiated (-UV) or UV irradiated (0h), were incubated for different times (0.5 to 4h). ChEC and DNA analyses were done as described in figures 7 and S5. Filter membranes were probed to detect the 2.23 and 2.9 kbp *EcoRI* fragments (A, B and C) containing portions of the 18S and 25S regions, respectively, or the 2.23, 2.9 and 2.44 kbp fragment containing the IS. Symbols are: “a” for active and “i” for inactive rDNA chromatin.

DISCUSSION

At least four models are proposed to describe the fate of an arrested RNAPII at a CPD, it could: (i) transcribe through the lesion (Marietta & Brooks, 2007; Walmacq et al., 2012), (ii) remain at the damaged site and undergo conformational changes to allow repair (Lagerwerf, Vrouwe, Overmeer, Foustéri, & Mullenders, 2011), (iii) be moved from the damaged site by reverse translocation without separating from the DNA strand, or (iv) be released from the DNA (Tornaletti, 2009). In contrary to our current knowledge on RNAPII, very little is known about the fate of RNAPI on the damaged TS of rRNA genes, but an *in vitro* study suggested that RNAPII and RNAPI blocked at CPDs could be released (Hara, Selby, Liu, Price, & Sancar, 1999). To investigate the fate of RNAPI on damaged rRNA genes *in vivo*, we exploited the yeast rDNA locus where active rRNA genes are transcribed at very high rate, are loaded with RNAPI (French et al., 2003; Merz et al., 2008) and are largely devoid of nucleosomes. Conversely inactive rRNA genes are covered by nucleosomes (Conconi et al., 1989; Dammann et al., 1993; Merz et al., 2008). In an early study we found that UV irradiation induced the inactivation of rRNA genes and hypothesized that it was caused by the dissociation of RNAPI from the rDNA (Conconi et al., 2005). Here, ChIP using TAP tagged RNAPI was used to show the dissociation of RNAPI from the damaged TS. Although studies using *in vivo* models have to compromise with populations of randomly damaged DNA, the calculation for Gaussian distributions of CPDs in sequential fragments of the rDNA coding region allowed to determine the average length, from the transcription start site, where most of the rRNA genes had at least one CPD. We defined such DNA region as “the likely position of the first CPD”, which corresponds to ~2.96 kb downstream of the transcription start site and where most rRNA genes (~87.3%) have at least 1 CPD in the TS. In *WT* cells, behind this region RNAPI occupancy dropped to ~20% within the first 30 min after irradiation. After 4 hours most of the RNAPI occupancy was restored over the entire transcribed region, which correlated with the majority of rDNA being repaired (Conconi et al., 2005) and recovery of transcription, measured by the TRO assay. Conversely in NER deficient *rad14Δ* cells, RNAPI occupancy dropped to values that were close to experimental background level and

there was no recovery of transcription even after 4 hours incubation. Before the likely position of the first CPD, the rDNA was loaded with RNAPI throughout the incubation time following UV irradiation, in both *WT* and NER deficient mutants. Furthermore there was some accumulation (~1.5-2 times) of RNAPI at the rDNA 5'-end, thus we analyzed the presence of RNAPI transcription factors. At the promoter, UAF may recruit CF as it is bound to UE of both inactive and active rRNA genes (Keys et al., 1994; Meier & Thoma, 2005) and its presence remained constant during the entire incubation time following irradiation. Conversely, the CF protein is only bound to CE in front of active rRNA genes and its binding increased ~2-3 times after irradiation, closely correlating with the accumulation of RNAPI at the 5'-end. Since stalled RNAPII might be removed from DNA damage sites by proteolysis (Woudstra et al., 2002), we followed the stability of RNAPI in UV irradiated cells. The results showed enhanced degradation after UV treatment that exceeded ~3 times its half-life stability in absence of irradiation, indicating that RNAPI stalled at CPDs could, at least in part, be removed by degradation. Nonetheless, at 4 hours after UV treatment ~15% of the initial RNAPI content remained as pool for transcription initiation, which correlated with the amount monitored by ChIP. These results showed that there were enough RNAPI to re-initiate transcription, and the TRO assay indicated that transcription elongation occurred before the likely position of the first CPD. Data that were visually confirmed by micrographs obtained from Miller's spreads and that, in addition, demonstrated the existence of the ternary complex rDNA/RNAPI/rRNA. Although there are evidences that cells repair DNA lesions without displacing stalled RNAPII, in this study we show that RNAPI dissociated from UV damaged rDNA. The different fates of RNAPII and RNAPI at CPDs could result from their intrinsic characteristics: whereas few RNAPII were found per transcription unit (Jackson, Iborra, Manders, & Cook, 1998), rRNA genes are highly transcribed and densely covered by RNAPI [one RNAPI every ~130 bp in the yeast rDNA (French et al., 2003)]. Under these circumstances, dissociation of an arrested RNAPI at a CPD could result from the push from the next approaching polymerase. This interpretation is in accordance with an *in vitro* study of trailing (elongating) and leading (stalled) T7 RNA polymerases (T7 RNAP), which also transcribe DNA at very high rate (Zhou & Martin, 2006). The collision between polymerases caused the release of the leading T7 RNAP while the trailing complex continued elongation to the stall site.

Nucleosomes and RNAPI compete for space on the rRNA genes (reviewed in Toussaint *et al*, 2005; Tremblay *et al*, 2009). Upon UV treatment, the inactivation of rRNA genes correlated with changes in psoralen crosslinking, which was confirmed by changes in restriction enzyme accessibility and implied closing of chromatin (Conconi *et al.*, 2005). Furthermore inactivation of rDNA chromatin occurred in the absence of NER, namely in *rad1Δ* and *rad14Δ* cells (Conconi *et al.*, 2005). This excluded the possibility that changes in psoralen crosslinking, and nuclease accessibility, were caused by the presence of the NER complex itself, rather than by closing of chromatin. In fact, Rad14 participates in a very early step of the NER pathway and is required for targeting the repair complex to the damaged site, and Rad1 is required for endonuclease cleavage at the 5' of the DNA lesion and for correct assembly of the NER complex at the damaged site (Prakash & Prakash, 2000). The data obtained by the combination of ChEC and psoralen crosslinking confirmed that closing of rDNA chromatin correlated with loading of nucleosomes on what were the active genes before UV irradiation. As NER proceeded and transcription resumed, the same combination of assays showed that re-opening of rDNA chromatin resulted from the replacement of nucleosomes by RNAPI and Hmo1. However, chromatin closing was not complete since Hmo1 remained partially associated with the rDNA. In summary, the data presented here put forward a sequence of events whereby after UV irradiation there is continuous RNAPI transcription initiation, followed by elongation to the first CPD present in the TS where RNAPI dissociate. The ternary complexes that result from transcription re-initiation and elongation prevent the deposition of nucleosomes. A different scenario takes place between two CPDs, where most of the RNAPI dissociate and are replaced by nucleosomes. After repair of CPDs, elongating RNAPI restore the non-nucleosomal structure, starting at the 5'-end and sequentially spreading throughout the coding region (Fig 9). Analogously, it was shown that the replication fork entering upstream of a transcriptionally active, non nucleosomal, rRNA gene generated two newly replicated coding regions regularly packaged into nucleosomes (Lucchini & Sogo, 1995). Thereafter, regeneration of non-nucleosomal rDNA was found to be a post-replicative process that is mediated by transcription initiation and RNAPI advancing through the template (Lucchini & Sogo, 1995; Wittner *et al.*, 2011).

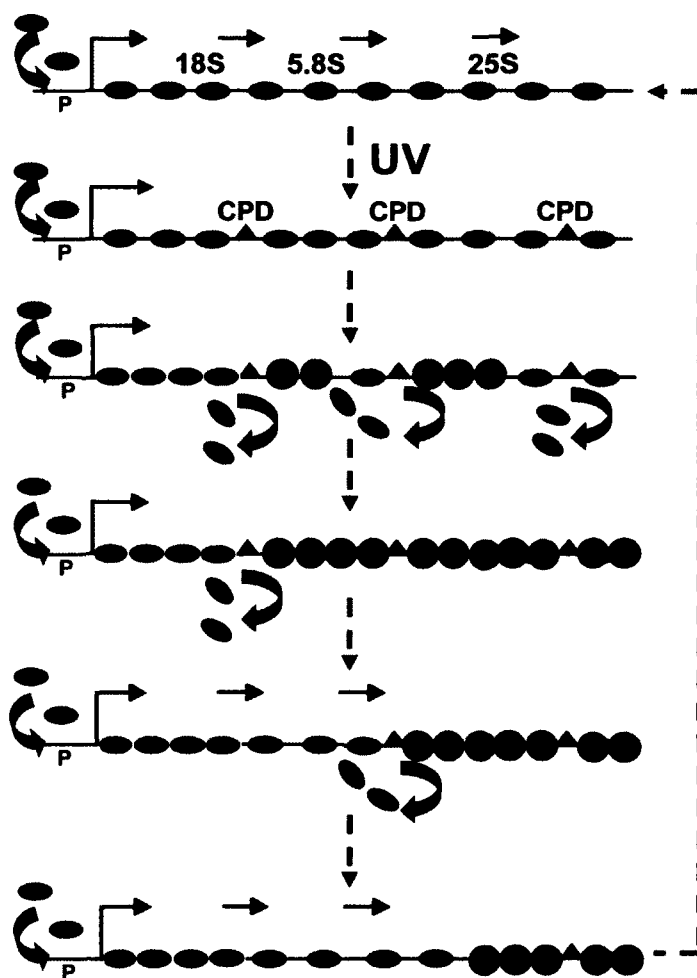


Figure 9: Displaced RNAPI are replaced by nucleosomes. The cartoon summarizes previously published results (Conconi et al., 2005) in combination with the data presented in this study. Ovals: RNAPI, circles: nucleosomes, triangles: CPDs, P: promoter, thin arrows: initiation and direction of transcription.

In the rDNA locus, NER must occur in parallel to transcription elongation, displacement of RNAPI from the damaged sites and nucleosomes loading. The efficiency of DNA repair is restricted by the presence of nucleosomes (Smerdon & Conconi, 1998; Thoma, 2005) and NER, like photolyase, repairs UV induced photoproducts in non-nucleosomal rDNA faster than in nucleosomal rDNA (Conconi et al., 2002, 2005; Meier, Livingstone-Zatchej, & Thoma, 2002). In an early study we found that inactive rRNA

genes were only repaired by GGR, whereas active rRNA genes were repaired by both TCR and GGR (Tremblay, Teng, Paquette, Waters, & Conconi, 2008). Since during the early repair times the band corresponding to active rDNA chromatin is no longer evident and is replaced by a smear, which represents partially inactivated rRNA genes, we suggest that GGR repairs patches of inactivated chromatin within active rRNA genes, and speculate that at least two processes can occur simultaneously in different rDNA regions of active rRNA genes: CPDs are processed by TCR when stalled RNAPI are recognized before falling off from the TS or, alternatively, stalled RNAPI are displaced before initiation of TCR and nucleosomes are loaded, inactivating portions of rRNA genes that are repaired by GGR.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs Sarah French and Ann Beyer (University of Virginia) for introducing us to the Miller spreading technique. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). MT and AC designed research; MT did most of the experiments, RC and MW performed the ChEC assay and GL provided the initial ChIP data; AC and JG wrote the manuscript. Our collaboration was supported by a mobility program accompanied by the Bavarian Research Alliance GmbH as an assignment from the Bavarian State Chancellery to JG and by the Ministère des Relations Internationales du Québec to AC.

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Banditt, M., Koller, T., & Sogo, J. M. (1999). Transcriptional activity and chromatin structure of enhancer-deleted rRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19(7), 4953–60.
- Bier, M., Fath, S., & Tschochner, H. (2004). The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Letters*, 564(1-2), 41–46. doi:10.1016/S0014-5793(04)00311-4
- Bohr, V., Smith, C., Okumoto, D., & Hanawalt, P. (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, 40, 359–369.
- Bordi, L., Cioci, F., & Camilloni, G. (2001). In vivo binding and hierarchy of assembly of the yeast RNA polymerase I transcription factors. *Molecular biology of the cell*, 12(3), 753–60.
- Carey, M., Smale, S., & Peterson, C. (2009). Nuclear run-on assay. *Transcriptional regulation in eukaryotes, concepts, strategies, and techniques*, 2nd ed (pp. 63–69).
- Conconi, A., Bernalov, V. a, & Smerdon, M. J. (2002). Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 649–54. doi:10.1073/pnas.022373099
- Conconi, A., Paquette, M., Fahy, D., Bernalov, V. A., & Smerdon, M. J. (2005). Repair-Independent Chromatin Assembly onto Active Ribosomal Genes in Yeast after UV Irradiation. *Molecular and cellular biology*, 25(22), 9773–9783. doi:10.1128/MCB.25.22.9773
- Conconi, A., Widmer, R. M., Koller, T., & Sogo, J. M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell*, 57(5), 753–761.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., & Sogo, J. M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research*, 21(10), 2331–8.
- Fahy, D., Conconi, A., & Smerdon, M. J. (2005). Rapid changes in transcription and chromatin structure of ribosomal genes in yeast during growth phase transitions. *Experimental cell research*, 305(2), 365–73. doi:10.1016/j.yexcr.2005.01.016

- Fousteri, M., & Mullenders, L. H. F. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell research*, 18(1), 73–84. doi:10.1038/cr.2008.6
- Fousteri, M., Vermeulen, W., Van Zeeland, A. a, & Mullenders, L. H. F. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Molecular cell*, 23(4), 471–82. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.029
- French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M., & Beyer, A. L. (2003). In Exponentially Growing *Saccharomyces cerevisiae* Cells , rRNA Synthesis Is Determined by the Summed RNA Polymerase I Loading Rate Rather than by the Number of Active Genes. *Molecular and cellular biology*, 23(5), 1558–1568. doi:10.1128/MCB.23.5.1558
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., & Ellenberger, T. (2006). DNA Repair and Mutagenesis, 2nd edition (2nd Editio.). Washington, DC: ASM Press.
- Hanawalt, P. C., & Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair : two decades of progress and surprises. *Molecular cell biology*, 9(DECeMBER), 958–970. doi:10.1038/nrm2549
- Hara, R., Selby, C. P., Liu, M., Price, D. H., & Sancar, a. (1999). Human transcription release factor 2 dissociates RNA polymerases I and II stalled at a cyclobutane thymine dimer. *The Journal of biological chemistry*, 274(35), 24779–86.
- Jackson, D. a, Iborra, F. J., Manders, E. M., & Cook, P. R. (1998). Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Molecular biology of the cell*, 9(6), 1523–36.
- Keys, D. a, Vu, L., Steffan, J. S., Dodd, J. a, Yamamoto, R. T., Nogi, Y., & Nomura, M. (1994). RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 8(19), 2349–2362. doi:10.1101/gad.8.19.2349
- Lagerwerf, S., Vrouwe, M. G., Overmeer, R. M., Fousteri, M. I., & Mullenders, L. H. F. (2011). DNA damage response and transcription. *DNA repair*, 10(7), 743–50. doi:10.1016/j.dnarep.2011.04.024
- Lainé, J.-P., & Egly, J.-M. (2006). Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 25(2), 387–97. doi:10.1038/sj.emboj.7600933
- Lucchini, R., & Sogo, J. M. (1995). Replication of transcriptionally active chromatin. *Nature*, 374(16), 276–280.

- Marietta, C., & Brooks, P. J. (2007). Transcriptional bypass of bulky DNA lesions causes new mutant RNA transcripts in human cells. *EMBO reports*, 8(4), 388–93. doi:10.1038/sj.embor.7400932
- Meier, A., Livingstone-Zatchej, M., & Thoma, F. (2002). Repair of active and silenced rDNA in yeast: the contributions of photolyase and transcription-couples nucleotide excision repair. *The Journal of biological chemistry*, 277(14), 11845–52. doi:10.1074/jbc.M110941200
- Meier, A., & Thoma, F. (2005). RNA Polymerase I Transcription Factors in Active Yeast rRNA Gene Promoters Enhance UV Damage Formation and Inhibit Repair. *Molecular and cellular biology*, 25(5), 1586–1595. doi:10.1128/MCB.25.5.1586
- Mellon, I., Spivak, G., & Hanawalt, P. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, 51, 241–249.
- Merz, K., Hondele, M., Goetze, H., Gmelch, K., Stoeckl, U., & Griesenbeck, J. (2008). Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes & development*, 22(9), 1190–204. doi:10.1101/gad.466908
- Mueller, J. P., & Smerdon, M. J. (1995). Repair of plasmid and genomic DNA in a rad7 delta mutant of yeast. *Nucleic acids research*, 23(17), 3457–64.
- Ness, P. J., Labhart, P., Banz, E., Koller, T., & Parish, O. W. (1983). Chromatin Structure along the Ribosomal DNA of *Dictyostelium*. *Journal of molecular biology*, 166, 361–381.
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. a. (2009). *Quantitation of protein. Methods in enzymology* (1st ed., Vol. 463, pp. 73–95). Elsevier Inc. doi:10.1016/S0076-6879(09)63008-1
- Osheim, Y. N., French, S. L., Sikes, M. L., & Beyer, A. L. (2008). Electron microscope visualization of RNA transcription and processing in *Saccharomyces cerevisiae* by Miller chromatin spreading. In R. Hancock (Ed.), *The Nucleus: Volume 2: Chromatin, Transcription, Envelope, Proteins, Dynamics and Imaging* (Vol. 464, pp. 55–69). Humana Press. doi:10.1007/978-1-60327-461-6_4
- Prakash, S., & Prakash, L. (2000). Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 451(1-2), 13–24. doi:10.1016/S0027-5107(00)00037-3
- Rudolph, C. J., Upton, A. L., & Lloyd, R. G. (2007). Replication fork stalling and cell cycle arrest in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Genes & development*, 21(6), 668–81. doi:10.1101/gad.417607

- Schmid, M., Durussel, T., & Laemmli, U. K. (2004). ChIC and ChEC; genomic mapping of chromatin proteins. *Molecular cell*, 16(1), 147–57. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.007
- Smerdon, M. J., & Conconi, A. (1998). Modulation of DNA damage and DNA repair in chromatin. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 62, 227–255.
- Smerdon, M. J., & Thoma, F. (1990). Site-specific DNA repair at the nucleosome level in a yeast minichromosome. *Cell*, 61(4), 675–84.
- Smith, J. S., Caputo, E., & Boeke, J. D. (1999). A genetic screen for ribosomal DNA silencing defects identifies multiple DNA replication and chromatin-modulating factors. *Molecular and cellular biology*, 19(4), 3184–97.
- Sogo, J. M., & Thoma, F. (2003). The Structure of rDNA Chromatin. *The Nucleolus*.
- Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L. I., & Moss, T. (2006). Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Molecular cell*, 21(5), 629–39. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.023
- Thoma, F. (2005). Repair of UV lesions in nucleosomes--intrinsic properties and remodeling. *DNA repair*, 4(8), 855–69. doi:10.1016/j.dnarep.2005.04.005
- Tornaletti, S. (2009). DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(6), 1010–20. doi:10.1007/s00018-009-8738-x
- Toussaint, M., Levasseur, G., Tremblay, M., Paquette, M., & Conconi, A. (2005). Psoralen photocrosslinking , a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I - transcribed ribosomal genes 1. *Biochemical and Cellular Biology*, 83, 449–459. doi:10.1139/O05-141
- Tremblay, M., Teng, Y., Paquette, M., Waters, R., & Conconi, A. (2008). Complementary roles of yeast Rad4p and Rad34p in nucleotide excision repair of active and inactive rRNA gene chromatin. *Molecular and cellular biology*, 28(24), 7504–13. doi:10.1128/MCB.00137-08
- Tremblay, M., Toussaint, M., D'Amours, A., & Conconi, A. (2009). Nucleotide excision repair and photolyase repair of UV photoproducts in nucleosomes : assessing the existence of nucleosome and non-nucleosome rDNA chromatin in vivo. *Biochemical and Cellular Biology*, 346, 337–346. doi:10.1139/O08-128
- Vogelauer, M., Cioci, F., & Camilloni, G. (1998). DNA protein-interactions at the *Saccharomyces cerevisiae* 35 S rRNA promoter and in its surrounding region. *Journal of molecular biology*, 275(2), 197–209. doi:10.1006/jmbi.1997.1451

- Walmacq, C., Cheung, A. C. M., Kireeva, M. L., Lubkowska, L., Ye, C., Gotte, D., Strathern, J. N., et al. (2012). Mechanism of Translesion Transcription by RNA Polymerase II and Its Role in Cellular Resistance to DNA Damage. *Molecular Cell*, 46(1), 18–29. doi:10.1016/j.molcel.2012.02.006
- Wittner, M., Hamperl, S., Stöckl, U., Seufert, W., Tschochner, H., Milkereit, P., & Griesenbeck, J. (2011). Establishment and maintenance of alternative chromatin states at a multicopy gene locus. *Cell*, 145(4), 543–54. doi:10.1016/j.cell.2011.03.051
- Woudstra, E. C., Gilbert, C., Fellows, J., Jansen, L., Brouwer, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et al. (2002). A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature*, 415(6874), 929–33. doi:10.1038/415929a
- Zhou, Y., & Martin, C. T. (2006). Observed instability of T7 RNA polymerase elongation complexes can be dominated by collision-induced “bumping”. *The Journal of biological chemistry*, 281(34), 24441–8. doi:10.1074/jbc.M604369200

Chapitre 3

L'accessibilité au dommage par la NER chez *Saccharomyces cerevisiae* dans le locus de l'ADN ribosomal

RÉSUMÉ DU TRAVAIL

La réparation par globale du génome (GG-NER) retire une grande variété de lésions à l'ADN et semble nécessiter le complexe Rad7/16-Abf1. Le rôle concret de ce complexe reste à clarifier : un modèle récent suppose que ce complexe est en cause au niveau de recrutement d'une HAT aux régions endommagées afin d'acétyler les queues des histones pour que les nucléosomes, ainsi acétylés, puissent être déplacés. Suite à la publication de ce modèle, une étude de l'effet d'une délétion de *RAD16* au niveau de la réparation du locus de l'ADNr fut entamée. Les cinétiques de réparation d'une souche *rad16Δ* laissaient présager un rôle supplémentaire de *RAD16* au niveau de la réparation de l'ADNr. Conséquemment, une augmentation de l'acétylation des nucléosomes préalablement à l'induction de dommages UV au sein de l'ADNr causerait une meilleure réparation par la GG-NER. Une telle augmentation est possible grâce à la délétion du gène *SIR2*. Les divers contrôles furent entamés afin de valider que la hausse de l'acétylation des histones au niveau de l'ADNr expliquait bel et bien la réparation par GG-NER accélérée chez *sir2Δ*. Par contre, ces contrôles n'ont pu être complétés au sein de cette thèse. Suite à ces contrôles, l'objectif est d'effectuer l'analyse des cinétiques de réparation chez une souche *rad16Δ-sir2Δ* afin de comprendre plus précisément le rôle de *RAD16* au niveau de la réparation par excision de nucléotides.

4.1 Matériel et méthode

4.1.1 Souches utilisées

Lors de cette étude, les souches de levure utilisées ont été obtenues de 2 sources différentes (tableau 3) : 1) de la collection du département de Microbiologie et d'Infectiologie (Université de Sherbrooke, Qc. Canada) basée sur des dérivés de la souche BY4741 (YKO strains, Open Biosystems, Huntsville, AL, USA) et 2) gracieusement fournies par le Dr. J.S. Smith (SMITH *et al.*, 1999). Afin d'éviter les contaminations, les souches furent premièrement cultivées sur milieu sélectif, décrits ci-bas, pour ensuite être cultivées en tout temps dans un milieu riche YeP [1% Bacto-Yeast extract (USB, Cleveland, OH, USA), 2% Bacto-peptone (USB, Cleveland, OH, USA) et 0,01% adénine (Sigma, St-Louis, MO, USA)] + 2% glucose, à 30°C. La croissance en milieu riche est de norme lors de cette étude, puisque la transcription de l'ARN ribosomal est fortement couplée avec les conditions de croissance. Les milieux sélectifs utilisés variaient selon les souches et sont les suivants : YeP + 2% glucose supplémenté de 200 µg/ml G-418 (Sigma, St-Louis, MO, USA) pour les souches possédant le gène KanMX ou les milieux « yeast synthetic complete » (SC) SC -Leu ou SC -Ura (l'acide aminé retiré) selon le marqueur nutritionnel inséré dans la souche [SC : 0,17% Yeast nitrogen base (Bioshop, Burlington, ON, Canada), 20 µg/ml adénine, 110 µg/ml acide L-aspartique 20 µg/ml L-arginine, 110 µg/ml L-cystéine, 90 µg/ml L-isoleucine, 20 µg/ml L-méthionine, 60 µg/ml L-phénylalanine, 60 µg/ml L-proline, 450 µg/ml L-sérine, 125 µg/ml L-thréonine, 70 µg/ml L-tyrosine, 1000 µg/ml acide L-glutamique, 20 µg/ml L-histidine, 80 µg/ml L-leucine, 60 µg/ml L-lysine, 20 µg/ml L-tryptophane, 50 µg/ml uracile (tous provenant de Sigma, St-Louis, MO, USA)].

Tableau 3: Description des souches utilisées au cours de cette étude.

<i>Souche</i>	<i>Génotype</i>	<i>Origine</i>
JS311	MATa, <i>his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ0, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty1-MET15, mURA3/HIS3</i>	SMITH <i>et al.</i> , 1999
JS343	MATa, <i>his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ0, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty1-MET15, sir2Δ::KanMX</i>	SMITH <i>et al.</i> , 1999
JS- <i>rad34Δ</i>	MATa, <i>his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ0, trp1Δ63, ura3-167, RDN1::Ty1-MET15, mURA3/HIS3, rad34Δ::LEU2</i>	Cette étude
JS- <i>rad16Δ</i>	MATa, <i>his3Δ200, leu2Δ1, met15Δ0, trp1Δ63, ura3-167,</i>	Cette étude

	RDN1::Tyl-MET15, mURA3/HIS3, <i>rad16Δ</i>::KanMX	
JS- <i>rad33Δ</i>	MATa, <i>his3Δ200</i>, <i>leu2Δ1</i>, <i>met15Δ0</i>, <i>trp1Δ63</i>, <i>ura3-167</i>, RDN1::Tyl-MET15, mURA3/HIS3, <i>rad33Δ</i>::LEU2	Cette étude
BY4741	MATa, <i>his3Δ1</i>, <i>leu2Δ0</i>, <i>met15Δ0</i>, <i>ura3Δ0</i>	Collection départementale
BY- <i>rad26Δ</i>	MATa, <i>his3Δ1</i>, <i>leu2Δ0</i>, <i>met15Δ0</i>, <i>ura3Δ0</i>, <i>rad26Δ</i>::KanMX	Collection départementale
BY- <i>sir2Δ</i> - <i>rad26Δ</i>	MATa, <i>his3Δ1</i>, <i>leu2Δ0</i>, <i>met15Δ0</i>, <i>ura3Δ0</i>, <i>sir2Δ</i>::KanMX, <i>rad26Δ</i>::LEU2	Martin Toussaint, Ph.D.

4.1.2 Création des souches par transformation PCR

Grâce à une recombinaison homologue efficace chez *S. cerevisiae*, il est possible d'utiliser, pour retirer un gène cible, une technique basée sur l'amplification par PCR d'un marqueur flanqué de séquences homologues de 35 paires de bases contre le gène à retirer (Wach *et al*, 1994). Les 35 paires de bases d'homologie sont ajoutées aux oligonucléotides servant d'amorces et, grâce à la série de plasmides pRS (Sikorski et Hieter, 1989; Brachmann *et al*, 1998), il est possible de sélectionner le marqueur selon ceux disponibles dans la souche ciblée pour effectuer la transformation. Ce protocole est inspiré de celui développé par le laboratoire de Woods (Gietz *et al.*, 1995).

Les oligonucléotides sélectionnés pour effectuer la délétion des gènes d'intérêts lors de cette étude sont décrits dans le tableau 4 et ont été synthétisés chez Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA). Ces derniers furent planifiés afin de retirer l'ORF en entier et contiennent 40 paires de bases d'homologie de chaque côté du gène d'intérêt et 20 paires de bases d'homologie envers les plasmides du système pRS. Suite à une amplification par PCR (voir figure 25), le fragment obtenu a été purifié sur gel d'agarose avec l'usage du « PureLink™ Quick Gel Extraction Kit » (Invitrogen, Eugene, OR. États-Unis) selon les recommandations du manufacturier.

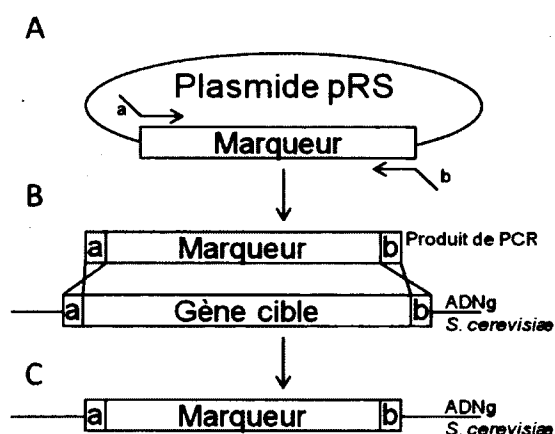


Figure 25 : Description schématisée de la création des souches pour cette étude

(A) Un plasmide de la série pRS possédant un marqueur de sélection désiré est sélectionné et utilisé lors d'une amplification par PCR avec des amorces possédant une séquence d'homologie au gène cible (a et b). (B) Le produit de PCR résultant est mis en présence de la levure *S. cerevisiae* lors d'une transformation et il en résultera, par recombinaison homologue, un échange du gène cible par le marqueur (C) qui permettra la sélection des souches ayant perdu le gène cible. Figure traduite et adaptée de (Lundblad *et al*, 2001).

Par la suite, 1×10^8 cellules d'une culture fraîche de la souche ciblée pour la délétion du gène a été centrifugée à 9000 g dans une centrifugeuse de table pendant 10 secondes, le culot a été lavé une fois avec de l'eau stérile et, suite à une deuxième centrifugation de 10 secondes, le culot fut resuspendu dans 1 ml de 1X TE/LiAc (0,1 M Acétate de lithium, 10 mM Tris-HCL et 1 mM EDTA) pour un dernier lavage et a finalement été resuspendu dans un volume de 50 μ l de 1X TE/LiAc. Les cellules ont été mélangées avec 5 à 20 μ g du fragment de PCR purifié (Figure 25B), 50 μ g d'ADN entraîneur (ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé) et 300 μ l de 40% polyéthylèneglycol 4000 (préparé par le mélange de 800 μ l de 50% PEG 4000, 100 μ l 10X LiAc et 100 μ l 10X TE) avant d'être incubées à 30°C dans un bloc chauffant agitateur afin d'éviter la précipitation des cellules pour 30 minutes. Par la suite, un choc thermique fut effectué afin de favoriser l'entrée de l'ADN dans la levure en transférant ces dernières dans un second bloc chauffant à 42°C pour 15 minutes. Elles furent ensuite centrifugées de nouveau dans une centrifugeuse de table à 9000 g pour 10 secondes et le culot fut resuspendu dans 500 μ l d'eau stérile. Si le marqueur sélectif était KanMX4 (conférant la résistance à la molécule antibiotique G-418), les cellules étaient incubées dans 10 ml de YeP + 2% glucose durant la nuit à 30°C avant d'être déposées sur des plaques de YeP + 2% glucose, 200 μ g/ml G-418 (Sigma-Aldrich,

St-Louis, MO) afin de permettre aux levures d'exprimer le gène de résistance. Dans le cas des marqueurs auxotrophiques, les cellules étaient directement placées sur des plaques SC-Leu ou SC-Ura selon le marqueur intégré et incubées 2 jours à 30°C avant l'analyse des colonies présentes où un évènement de recombinaison homologue aura eu lieu (Figure 25C). Dans tous les cas, une confirmation de la délétion du gène d'intérêt fut effectuée par PCR ou par analyse de sites de restrictions suite à un transfert de type Southern (tel que décrit dans Sambrook *et al*, 1989) pour au moins 16h.

Tableau 4: Oligonucléotides utilisés pour la création des souches.

<i>Souche</i>	<i>Sens</i>	<i>Oligonucléotide</i>
JS-rad16A	5'→3'	CCG ACA GTA TAA CGA CGT AAT GCT GCG TGG TGT TTT CAA ACC AGA TTG TAC TGA GAG TGC AC
	3'→5'	GAA TAA GAA CTG TAA ATC AGC TGG CGT TAG TCT GCT AAT GGC CTG TGC GGT ATT TCA CAC CG
JS-rad33A	5'→3'	AGC CGC AAG GTC ACC TAA ATA CCT TOC GAG TTT TTT TTC AAG ATT GTA CTG AGA GTG CAC
	3'→5'	AAT AAA GGA GAA AAA ATA TTT GAA TAT GGA TTT GTT CGC TCT GTG CCG TAT TTC ACA CCG
JS-rad34A	5'→3'	GCC AGG GTG AAT GAC CAA ATT OGA TAT TCA ACG AAG GGT CAG ATT GTA CTG AGA GTG CAC
	3'→5'	GTG CAA ACA TTT ATA OCC TCT GCG AAA CAG CGT CGA ATC CCT GTG CCG TAT TTC ACA CCG

4.1.3 Courbes de croissance

La comparaison des courbes de croissances de diverses souches suite à l'irradiation aux UV permet de détecter des souches de levure présentant un phénotype de sensibilité aux rayons ultraviolets. Cette technique, développée dans notre laboratoire (Toussaint *et al*, 2006; Toussaint et Conconi, 2006), est rapide à effectuer et très sensible.

Le jour précédant l'expérience, les souches d'intérêts furent inoculées dans 10 ml de bouillon YeP + 2% glucose et incubées à 30°C durant la nuit afin d'obtenir des cultures en phase exponentielle de croissance au lendemain. Les cellules ont été transférées dans un tube conique de 15 ml avant d'être centrifugées à 3200 g pour une minute afin de retirer le milieu de culture (qui absorbe les rayonnements ultraviolets et fausse donc les

expérimentations). À ce culot, 10 ml d'eau stérile a été ajouté, le culot a été resuspendu et une centrifugation fut répétée de nouveau pour ensuite retirer le surnageant. Le culot a été resuspendu dans 5 ml d'eau stérile, la densité optique des cultures a été mesurée à 660nm et les cellules furent diluées à une concentration de $0,8 \times 10^7$ cellules/ml dans de l'eau stérile. De ces cultures diluées, un volume de 350 μ l a été placé sur une plaque de verre autoclavée, où des cercles de cire ont préalablement été tracés afin de contenir le liquide en une goutte. Avant l'exposition aux rayons UV, 5 μ l en triplicata ont été prélevés et resuspendus dans une plaque de 96 puits contenant 95 μ l de milieu YeP + 2% glucose. Par la suite, une irradiation de 50 J/m², calculée grâce à l'utilisation d'un radiomètre digital UVX équipé d'un détecteur à UVc (détecteur de modèle UVX-25 – UVP Inc. Upland, CA. États-Unis), a été effectuée et le prélèvement de 5 μ l en triplicata fut répété de nouveau. Deux irradiations additionnelles de 50 J/m² ont été effectuées, pour l'obtention de courbes de croissance à des conditions finales d'irradiation de 0, 50, 100 et 150 J/m². La plaque de 96 puits a été transférée dans un lecteur de plaque à 30°C avec vibration (Modèle PowerWave XS de Bio-Tek, Winooski, VT, États-Unis) pour une lecture de la densité optique à 660 nm aux 10 minutes pendant 48h. Suite à cette incubation, les données furent transférées dans le logiciel Excel (Microsoft, Redmond, WA, États-Unis) pour analyse et création des courbes de croissance.

4.1.4 Test de sensibilité par dilutions en séries

Ce test fut essentiellement effectué en parallèle aux expériences de courbes de croissance. Lors du jour précédant l'expérience, les souches d'intérêts de levure furent inoculées dans 10 ml de milieu YeP + 2% glucose et incubées à 30°C pour la nuit. L'expérience, le lendemain, débutait lorsque la concentration de levure dans le milieu était à $1,2 \times 10^7$ cellules/ml. À cette densité de levure, la densité optique lue à 660 nm est de 0,4 pour les souches utilisées dans cette étude. Une quantité de $2,0 \times 10^6$ cellules fut prélevée et transférée dans un tube de 1,5 ml avant d'être centrifugée à 9000 g pour 1 minute. Afin d'effectuer un second lavage, le surnageant fut décanté et 1 ml d'eau stérile fut ajoutée au culot avant une nouvelle phase de centrifugation. À ce culot, 100 μ l d'eau stérile

(concentration finale de $2,0 \times 10^7$ cellules/ml) est ajouté (tube #1). Les cellules furent diluées en série 5 fois 1:10 par l'ajout de 10 µl de levures dans 90 µl d'eau stérile (6 tubes, du tube #1 à $2,0 \times 10^7$ cellules/ml au tube #6 à $2,0 \times 10^2$ cellules/ml). Cinq microlitres de levure des tubes #2 à #6 fut déposé sur une plaque de milieu YeP + 2% glucose par conditions analysées ainsi qu'une plaque « contrôle ». Avant l'irradiation à la dose désirée (qui fut calculée grâce à l'utilisation d'un radiomètre digital UVX équipé d'un détecteur à UVc (détecteur de modèle UVX-25 – UVP Inc. Upland, CA. États-Unis)), les plaques furent séchées 10 minutes et, suite à l'irradiation, incubées dans le noir (afin d'éviter la réparation des dommages par la photolyase) pour au moins 48h à 30°C avant la prise de photographies.

4.1.5 Courbes de réparation par la NER de l'ADN ribosomal séparé

Cette section décrira l'ensemble des méthodes utilisées afin de pouvoir analyser, dans le temps, la réparation des dommages causés par les rayons UVc chez notre modèle d'étude, *S. cerevisiae*, au niveau du locus des gènes encodant l'ARNr. Cette méthode fut initialement élaborée dans le laboratoire du Dr. Smerdon (Bespalov *et al*, 2001; Conconi *et al*, 2002) à partir de divers travaux antérieurs (Sutherland et Shih, 1983; Freeman *et al*, 1986). Elle est maintenant utilisée sous la forme décrite ci-dessous dans notre laboratoire (Tremblay *et al*, 2008; Conconi *et al*, 2005).

4.1.5.1 Création de dommages par les rayons ultraviolets et collecte des points de réparation

Tout d'abord, la souche d'intérêt de levure est inoculée dans 1 L de milieu YeP + 2% glucose et incubée à 30°C durant la nuit. L'expérience est effectuée le lendemain, lorsque la densité de levure du milieu est à $1,2 \times 10^7$ cellules/ml. Premièrement, il a été nécessaire de resuspendre les levures dans un volume final de 300 ml de (Phosphate Buffered Saline – 125 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0) gardé sur glace de la façon suivante : dans 8 tubes coniques de 50 ml, du milieu de culture, contenant la souche d'intérêt, est versé et centrifugé à 3200 g pour 3 minutes (centrifugeuse Centra CL3 équipée d'un rotor #243. Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA. États-Unis). Les culots de levure sont conservés et ces mêmes tubes sont remplis une autre fois de milieu de culture et centrifugés, tel que précédemment, jusqu'à ce que le litre entier de milieu de culture initial ait été centrifugé. Après la dernière ronde de centrifugation, les tubes sont drainés de YeP + 2% glucose en étant déposés, le col vers le bas, sur un papier buvard. Un drainage efficace est nécessaire car le YeP + 2% glucose absorbe les rayons ultraviolets. Ensuite, chacun des culots est resuspendu dans 35 ml de PBS froid et est transféré dans un erlenmeyer de 500 ml gardé sur glace. Les tubes sont tous rincés de façon séquentielle à l'aide de 20 ml de PBS qui a été ajouté aux levures gardées sur glace afin d'obtenir un volume final de 300 ml de PBS contenant 4×10^7 cellules/ml. Un aliquot de 45 ml, $1,6 \times 10^9$ cellules/ml est transféré dans un tube conique de 50 ml gardé sur glace : celui-ci est considéré l'échantillon non irradié (-UV). À partir de ce point, il est critique d'éviter toute lumière, au-delà de celle émise par des néons fluorescents jaunes (Osram Sylvania, Mississauga, Ontario. Canada) afin d'éviter l'activation de la CPD photolyase, présente chez *S. cerevisiae*. Le volume restant, soit 250 ml, est transféré dans un bac où l'épaisseur maximale de la suspension de levure est de 2 mm (le minimum étant 1 mm). Cette épaisseur ne doit pas être dépassée, afin d'éviter une absorption des rayons ultraviolets seulement par la couche supérieure de levure. Ce bac est installé dans une hotte à PCR (C.B.S. Scientific Co. Del Mar, CA. États-Unis) contenant des néons germicides émettant des UVc, à un pic de 254 nm. Les levures sont irradiées à une dose de 180 J/m², calculé grâce à l'utilisation d'un radiomètre digital UVX équipé d'un détecteur à UVc (détecteur de

modèle UVX-25 – UVP Inc. Upland, CA. États-Unis). Les levures irradiées sont transférées dans un second erlenmeyer, conservé sur glace, et bien brassées avant de prélever 45 ml dans un tube conique de 50 ml, lui-aussi conservé sur glace, cet échantillon est le « temps zéro » de réparation (+UV). Au volume restant de PBS (environ 210 ml), contenant la souche irradiée, est transféré dans 4 tubes coniques de 50 ml et centrifugé à 3200 g pour 3 minutes. Le surnageant est retiré et les culots séchés par inversion sur un papier buvard. Les culots sont resuspendus dans 250 ml de milieu YeP + 2% glucose frais préchauffé à 30°C et les levures sont incubées à cette température 4h dans le noir. Les échantillons « -UV » et « +UV » sont centrifugés pour 3 minutes à 3200 g, le PBS est retiré et les tubes sont inversés sur du papier buvard afin de bien retirer le surnageant restant. Les 2 culots sont resuspendus dans 1,5 ml de NIB froid (Nuclei Isolation Buffer – 50 mM acide morpholinepropanesulfonic [MOPS], pH 8,0, 150 mM acétate de potassium, 2 mM MgCl₂, 17% glycerol, 0,5 mM spermine et 0,15 mM spermidine), puis transférés dans un tube de polypropylène de 14 ml à fond arrondi (Becton Dickinson Labware. Franklin Lakes, NJ. États-Unis) contenant 1,5 ml de billes de verre (425-600 µm. Sigma. St-Louis, MO. États-Unis) préalablement rincées avec 2 ml de NIB. Ce tube est congelé à -80°C dans une cuve de métal afin d'éviter un contact avec la lumière. Aux temps de collecte de 30 minutes, 60 minutes, 2 heures et 4 heures, 50 ml de milieu de culture sont collectés dans un tube conique de 50 ml, centrifugé 3 minutes à 3200 g et le culot est resuspendu dans 45 ml de PBS pour, par la suite, effectuer les mêmes manœuvres que les échantillons « -UV » et « +UV » préalablement collectés. Au final, 6 échantillons ont été collectés : -UV, +UV, 30 minutes, 60 minutes, 2h et 4h.

4.1.5.2 Isolation de noyaux

L'une des étapes les plus importantes afin d'obtenir une bonne séparation des fractions de l'ADNr ouvert et fermé est de préparer des échantillons de noyaux dans lesquels la chromatine est bien conservée. Une chromatine instable, ou la présence de levures intactes dans la préparation finale de noyaux, affectera fortement la qualité des expériences de suivi de la réparation. La méthode de préparation décrite ci-dessous permet l'obtention de

noyaux d'une façon rapide et fiable. Il est important de toujours travailler sur glace lors de la préparation de noyaux afin de réduire le métabolisme cellulaire, tel que la réparation des dommages ou la transcription. De plus, afin de réduire le temps où les échantillons sont laissés sur glace (les processus biologiques étant seulement ralentis et non arrêtés par le froid), seul 2 échantillons de cellules collectés lors de l'irradiation seront préparés à la fois. Il faut donc répéter la technique suivante 3 fois pour obtenir les noyaux des 6 points collectés.

Dans un premier temps, les échantillons « -UV » et « +UV » sont retirés du congélateur et laissés sur glace, dans le noir, afin de dégeler (environ 15 minutes). Une fois dégelé, 100 µl de 10% triton X-100 (Fisher Scientific. Fair Lawn, NJ. États-Unis) sont ajoutés aux 2 échantillons et ils sont vortexés à vitesse maximale pour 30 secondes à 16 reprises avec, en alternance, un repos de 30 secondes sur glace entre chacune des séances de vortex. L'angle auquel les tubes sont vortexés alterne entre 45° (par rapport à un tube normalement placé sur un vortex) et 0° à chaque séquence, pour un total de 8 vortex dans chacune de ces 2 positions. Le lysat a été transféré dans un nouveau tube de 14 ml conservé sur glace et les billes de verre furent rincées 2 fois avec 1 ml de NIB, pour un total de 4 ml de lysat dans du NIB pour les 2 échantillons. Afin de précipiter les débris cellulaires, les tubes sont centrifugés à 2450 g pour 2,5 minutes et le surnageant, contenant les noyaux, est transféré dans un nouveau tube de 14 ml sur glace. Au culot de débris cellulaires, 2 ml de NIB sont ajoutés, le culot est bien resuspendu et une autre séquence de centrifugation de 2,5 minutes à 2450 g est effectuée. Le surnageant de ces tubes est ajouté au surnageant collecté précédemment, pour un total d'environ 6 ml de NIB. Afin de concentrer la préparation de noyaux, le NIB est transféré également dans 4 tubes de 2 ml (Axygen. Union City, CA. États-Unis), pour un total de 8 tubes pour les 2 échantillons et les tubes sont centrifugés à vitesse maximale (9000 g) pour 5 minutes dans une centrifugeuse à angle fixe (Microspin 24S Sorvall. Wilmington, DE. États-Unis). Le surnageant est retiré par inversion au-dessus d'un bécher et les tubes sont placés inversés sur un papier buvard pour être bien asséchés. Par la suite, les noyaux des 4 tubes sont resuspendus avec 200 µl de NIB de façon séquentielle et les 3 tubes restants sont rincés avec 600 µl de NIB, pour un volume final de 800 µl de NIB contenant les noyaux. Cette solution est aliquotée également (400 µl) dans 2

tubes de 1,5 ml (Axygen. Union City, CA. États-Unis) et ensuite stockés, dans une boîte noire, à -80°C.

4.1.5.3 Séparation de l'ADN ribosomal ouvert et fermé

La séparation de l'ADNr ouvert s'effectue par digestion à l'aide d'enzymes de restriction en se basant sur le principe que les nucléosomes, présents sur l'ADNr fermé, inhiberont l'accès à l'enzyme de restriction. Une digestion de courte durée libérera donc l'ADNr ouvert, où il y a absence de nucléosomes (Figure 26A). La séparation a été effectuée de la façon suivante : un aliquot de chaque point collecté précédemment a été laissé sur glace afin de dégeler (6 tubes au total). Une fois dégelés, les noyaux ont été précipités par centrifugation à vitesse maximale (environ 9000 g) pour 5 minutes dans une centrifugeuse à angle fixe (Microspin 24S Sorvall. Wilmington, DE. États-Unis). Le surnageant fut retiré à l'aide d'une pipette de 200 µl. À cette étape, il était très important de ne pas laisser de trace du surnageant car ce dernier affecterait négativement la libération de l'ADNr ouvert. Par la suite, le culot de noyaux fut resuspendu avec soin dans 500 µl de tampon *EcoRI* (New England BioLabs, Pickering, Ontario) car les noyaux avaient tendance à coller aux surfaces de plastique à cette étape. Par l'ajout de 5 µl d'*EcoRI* 5 U/µl (New England BioLabs, Pickering, Ontario) dans chaque tube, à des intervalles de 30 secondes, et une incubation dans un thermoagitateur (Eppendorf, Hamburg, Germany) à 37°C, 550 RPM pour 15 minutes, l'ADNr ouvert est libéré. Après ces 15 minutes d'incubation, 10 µl de 0,5 M EDTA (pH 8,0) furent rajoutés aux tubes, afin d'arrêter la réaction enzymatique, à des intervalles de 30 secondes et les tubes ont été transférés sur glace. Dans le but de contrôler l'efficacité de libération de l'ADNr ouvert, 100 µl d'échantillon de chacun des tubes furent prélevés et ajoutés à 700 µl de NIB dans un tube de polypropylène de 1,5 ml et entreposés par la suite à -80°C pour les contrôles d'efficacité par photopontage au psoralène (Décrits dans la section 4.1.5.7). Dans les 400 µl de noyaux restants, 100 µl de TE (Tris-EDTA – 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5), 225 µl d'acétate de sodium 3 M (3 M NaOAc – pH 5,2) et 35 µl de 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) sont ajoutés de façon séquentielle en brassant bien les tubes entre chaque addition et en effectuant une légère

centrifugation afin de faire descendre l'échantillon dans le fond du tube. Par 2 fois, un volume (environ 770 μ l) de phenol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) équilibré au pH 9,8 (à l'aide de 1 M Tris-HCl, pH 9,8) est ajouté à chacun des échantillons, ceux-ci ont été brassés vigoureusement et centrifugés 3 minutes à 9000 g, puis la phase aqueuse a été collectée. Afin de bien retirer toute trace de phénol, un volume (environ 770 μ l) de chloroforme a été ajouté au tube et, encore une fois, mélangé et centrifugé pour collecter la phase aqueuse une seconde fois. À partir de ce point, la manipulation des échantillons a été effectuée sous la lumière normale, la photolyase ayant été retirée de l'échantillon grâce aux extractions phénoliques. Aux 6 échantillons, un volume (environ 760 μ l) d'isopropanol 100% froid fut ajouté et les échantillons furent laissés à -20°C pour au moins 1 h avant d'être centrifugés à 18000 g, dans une centrifugeuse à godet balancier à une température de 4°C pour 20 minutes. Suite à la précipitation de l'ADN dans le fond des tubes, le surnageant a été retiré par inversion, 500 μ l de TE ajouté et l'ADN a été resuspendu par tapotements avant l'addition de 10 μ l de RNase A (10 mg/ml) et une incubation d'une heure à 37°C. Suite à la dégradation de l'ARN, 225 μ l 3 M NaOAc et 35 μ l 10 % SDS sont ajoutés avant d'effectuer une séquence d'extraction des protéines par phenol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et de chloroforme de la même façon que celle décrite en haut de cette page. À la phase aqueuse ainsi obtenue, un volume d'isopropanol 100% froid fut ajouté, les échantillons furent laissés à -20°C pour au moins 1 heure avant d'être centrifugés, de nouveau, dans la centrifugeuse à godet balancier. Le surnageant des échantillons a été retiré encore une fois par inversion, 1 ml d'éthanol 70% fut ajouté, afin retirer les sels pouvant être présents dans les échantillons. Les échantillons furent centrifugés, encore une fois, dans la centrifugeuse à godet balancier pour 10 minutes. Le culot d'ADN obtenu fut séché, suite à une inversion des tubes afin de retirer l'éthanol, dans une cuve à vide, pour environ 15 minutes, avant d'être resuspendus dans 100 μ l H₂O bi-distillée stérile. Une petite quantité d'ADN ainsi isolé, soit 2 μ l, fut visualisé sur un gel d'agarose de 0,8% afin d'évaluer la quantité d'ADN isolée et d'égaliser les quantités pour l'expérience de T4-endonucléase-V décrite dans la prochaine section. La libération de l'ADNr fermé (et donc non-préalablement digéré, Figure 26B) fut accomplie par l'ajout de 11 μ l de 10X NEBbuffer #2, 1 μ l 100x BSA et de 2,5 μ l *NheI* (New England BioLabs,

Pickering, Ontario) au volume restant. Les tubes furent placés dans un incubateur à 37°C pour au moins 6h, voire toute une nuit.

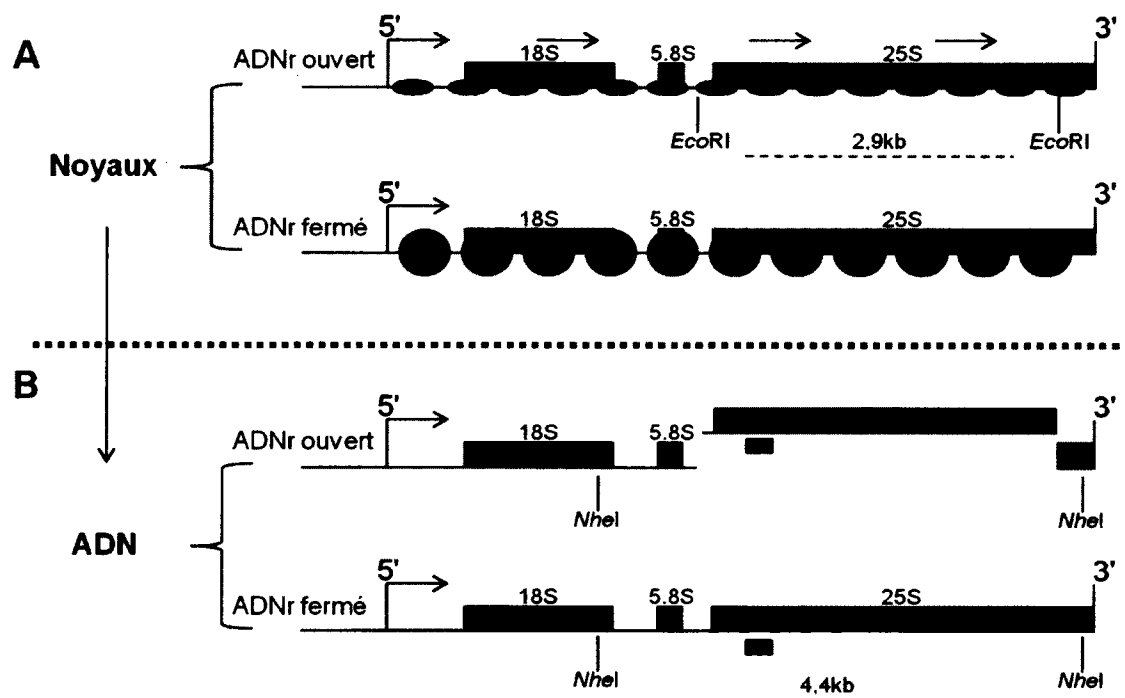


Figure 26 : Schématisation de la séparation de l'ADNr ouvert et fermé

(A) Lorsqu'une digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* est effectuée sur une préparation de noyaux, seul l'ADNr ouvert sera digéré par l'enzyme, les ARN polymérases I (billes vertes) n'inhibant pas l'accès aux sites de restriction comparativement aux nucléosomes (billes noires) qui, à l'inverse, inhiberont la digestion. Le fragment de restriction d'intérêt résultant possède une taille de 2,9 kb. (B) Suite à l'isolation de l'ADN, les protéines ont été retirées et, grâce à une seconde digestion enzymatique avec l'enzyme *NheI*, il est désormais possible de libérer l'ADNr fermé en un fragment de 4,4 kb. Le rectangle bleu indique la région hybridée par les sondes radioactives spécifiques aux brins transcrits ou non-transcrits.

4.1.5.4 T4-endonucléase-V

Suite à la libération totale de l'ADNr (ouvert et fermé) par les digestions successives, effectuées avec les enzymes *EcoRI* et *NheI*, et la visualisation de la présence de dommages de type CPD sur l'ADN est réalisée par l'utilisation de l'enzyme T4-endonucléase-V (20 U/μl. Epicentre, Madison, WI. États-Unis), qui effectuera des coupures simple-brins à

l'ADN au niveau des dommages de type CPD, et d'une migration sur un gel d'agarose en conditions dénaturantes par la méthode décrite dans cette section.

Les 6 échantillons (-UV, +UV, 30', 60', 2h et 4h de temps de réparation) laissés dans l'incubateur afin de libérer l'ADNr fermé (section précédente) sont retirés de celui-ci et 87,5 µl de TE leur est ajouté. Ensuite, les protéines sont retirées par une extraction à l'aide de 200 µl phenol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) suivi d'un chloroforme tel que décrit dans la section 4.1.5.3. Afin de précipiter l'ADN contenu dans ces tubes, 20 µl de 3 M NaOAc sont ajoutés et les échantillons sont mélangés avant l'ajout de 550 µl 100% éthanol. Suite à une incubation de 20 minutes à -80°C, ces 6 tubes sont centrifugés à 18000 g dans une centrifugeuse à godet balancier à une température de 4°C pour 20 minutes. Ensuite, les surnageants sont retirés par inversion des tubes, 1 ml d'éthanol 70% est ajouté, afin d'enlever la plus grande quantité de sels possible, avant une seconde centrifugation de 10 minutes. Les culots sont alors séchés dans une cuve à vide, pour environ 15 minutes, avant l'addition de 65 µl de tampon de réaction T4 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, pH 8.0). À cette étape, il est critique de très bien resuspendre l'ADN par un tapotage répété des tubes et une incubation dans un thermoagitateur à 37°C, à une vitesse de rotation de 900 RPM pour 1h, car une mauvaise resuspension affectera grandement la fiabilité des résultats subséquents. Pour chacun des points de réparation collectés (-UV, +UV, 30 min, 60 min, 2h et 4h), 2 tubes de 0,6 ml étiquetés + ou -T4 sont préparés, 2 µl de tampon de réaction T4 est ajouté aux tubes « -T4 » et 2 µl de la glycosylase T4-endonucléase-V (20 U/µl. Epicentre. Madison, WI. États-Unis), préalablement diluée 1:35 avec du tampon de réaction T4, est ajouté aux tubes « +T4 ». Par la suite, 15 µl d'ADN est ajouté à chacun des tubes et une incubation d'au moins 1,5h à 37°C est effectuée. Suite à la digestion enzymatique, 3 µl de tampon de chargement alcalin 6x (300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 18% (w/v) ficoll (type 400), 0.15% (w/v) Bromocresol green, 0.25% Xylene cyanol) est ajouté aux échantillons +/-T4 et ces derniers sont chargés sur un gel d'agarose alcalin dont la préparation est décrite dans la section suivante.

4.1.5.5 Gel d'agarose alcalin, buvardage de type Southern, hybridation et exposition

Afin d'obtenir un gel d'agarose alcalin fiable, ce dernier est préparé le jour précédant le chargement des échantillons. En un premier temps, la solution d'agarose (1% agarose, 0,05 M NaCl, 1 mM EDTA – Volume final de 280 ml) est chauffée dans un micro-onde et est refroidie jusqu'à environ 55°C avant d'être coulée dans un montage de maxi-gel (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, États-Unis). Pour s'assurer l'obtention de résultats « francs », le gel est laissé à température pièce pour au moins 2 h avant d'être placé dans un bain de tampon de migration alcalin (50 mM NaOH, 1 mM EDTA) afin d'équilibrer le pH du gel jusqu'au lendemain (au moins 12 h d'équilibration). Le gel est transféré dans le montage de migration avec du tampon de migration frais et les échantillons sont chargés sur le gel. Les échantillons sont migrés à 35 V pour 43 h. Après 1h de migration, afin d'assurer une bonne répartition des électrolytes, une pompe de recirculation (VWR, Mississauga, Ontario) est installée et le tampon de migration est changé pour du tampon frais après 22 h de migration. Une fois la migration terminée, le gel est placé dans un bain de 0,4 M NaOH pour 30 minutes et une membrane de nylon Hybond-XL (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec, Canada) est placée dans un bain de 2X SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Citrate de sodium, pH 7.0) pour 30 minutes avant d'être installés dans un montage de transfert de type Southern (tel que décrit dans Sambrook *et al*, 1989) pour au moins 16h.

Une fois le transfert terminé, la membrane est séchée à l'air pour 10 minutes avant d'être pré-hybridée 15 minutes dans 20 ml de 0,5 M Na₂HPO₄ à 37°C à l'intérieur d'un tube à hybridation (VWR, Mississauga, Ontario). Pendant ce temps, 20 ml de tampon d'hybridation (0,5 M Na₂HPO₄, 1% (p/v) BSA, 1mM EDTA, 1µg/ml tRNA, 0,07% SDS), dans un tube conique de 50 ml, est placé 10 minutes dans de l'eau bouillante, pour ensuite remplacer la solution de 0,5 M Na₂HPO₄ présente dans le tube contenant la membrane. Après 1 h d'incubation de la membrane avec la solution d'hybridation, une sonde ciblant le brin transcrit (5'-CCG ATA GCG AAC AAG TAC AGT GAT GG-3') ou le brin non-transcrit (5'-GGC CCA GTG AAA TGC GAG ATT CCC-3') de l'ADNr est ajoutée. Cette sonde est préalablement préparée par radio-marquage d'un oligonucléotide grâce à la T4-

polynucléotide kinase (New England BioLabs, Pickering, Ontario) et nettoyée à l'aide d'une colonne G-25 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec, Canada) tel que défini par ces 2 manufacturiers. Le lendemain, la membrane est lavée, de façon successive, 2 fois avec chaque tampon de lavage pour 5 minutes : Tampons « A » 0,5 M Na₂HPO₄, 1% SDS; « B » 0,25 M Na₂HPO₄, 0,5% SDS; « C » 0,1 M Na₂HPO₄, 0,5% SDS; « D » 0,05 M Na₂HPO₄, 0,5% SDS). Ensuite, la membrane est retirée du tube à hybridation et séchée pour 10 minutes à l'air libre pour ensuite être exposée sur un écran de phosphore, qui possède une plus grande gamme dynamique qu'un film (Johnston *et al.*, 1990), pour toute une nuit avant que le résultat soit révélé au Storm Imager (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec, Canada).

4.1.5.6 Quantification et création des courbes de réparation

La quantification a été effectuée avec l'aide du programme ImageQuant 5.0 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec, Canada). En un premier temps, le signal correspondant au bruit de fond des valeurs de signaux correspondant aux paires de +/- T4-endoV est retiré. Le bruit de fond correspond à la moyenne du signal en haut et en bas de la bande analysée. Ensuite, le ratio « Y » est calculé par la division du signal corrigé « +T4 » par le signal « -T4 » pour chacune des paires (Y_{UV}, Y_o, etc.). Il est possible d'avoir une estimation du nombre moyen de dommage par fragment (-ln(Y)) et ces résultats sont convertis en pourcentage de réparation par la formule $100 - (100 * (-\ln(Y_{\text{temps de réparation}}) / -\ln(Y_0)))$ (Bespalov *et al.*, 2001) pour être ensuite rapportés sur un graphique.

4.1.5.7 Contrôle de l'efficacité de libération de l'ADNr ouvert par photopontage au triméthylpsoralène

Afin de s'assurer que la libération de l'ADNr ouvert est complète, lors de la digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI*, (décrit dans la section 4.1.5.3) il est nécessaire de contrôler que seul l'ADNr ouvert est libéré. Ce contrôle doit être effectué au moins une fois pour chaque souche parentale utilisée.

Pour ce faire, les échantillons, entreposés à -80°C dans des tubes de polypropylène de 1,5 ml (section 4.1.5.3), sont dégelés sur glace en absence de lumière bleutée et 1 μl de triméthylpsoralène (800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans du DMF. Sigma, St-Louis, MO, USA) est ajouté. Suite à une incubation sur glace de 15 minutes dans le noir, chacun des échantillons est placé dans un puits d'une plaque 24-puits (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, États-Unis) sur glace. Cette plaque est glissée sous un « trans-illuminateur » (Modèle Blacklight blue lamps (315-400 nm) 15 W de Sankyo Denki, Hiratsuka, Kanagawa, Japon) à une distance d'un centimètre des échantillons. Un premier photo-pontage au psoralène est effectué par une irradiation à 365 nm pendant 10 minutes. Ensuite, les échantillons sont transférés de nouveau dans un tube de 1,5 ml contenant 1 μl de psoralène et le photo-pontage est répété pour un total de 4 fois. Une fois les photo-pontages terminés, les échantillons sont transférés dans des tubes de 1,5 ml et sont centrifugés à 9000 g durant 10 minutes. Le surnageant est retiré et le culot, contenant les noyaux, est resuspendu dans 400 μl de TE. Par la suite, 9 μl de 10% SDS, 5 μl de 0,2 M CaCl_2 et 10 μl de protéinase K (10 mg/ml, Bio Basic Canada Inc., Markham, Ontario, Canada) sont ajoutés aux tubes et ces derniers sont incubés 1 h à 55°C . Cette étape de digestion par la protéinase K est critique afin d'obtenir de l'ADN, puisque le photo-pontage au psoralène effectue aussi des pontages entre l'ADN et les protéines. Une fois la digestion par la protéinase K terminée, 450 μl de 5 M NaCl est ajouté aux échantillons avant d'être centrifugés dans une centrifugeuse à godet balancier à 18000 g pour 10 minutes à une température de 4°C . Suite à cette centrifugation, le surnageant, contenant l'ADN, est transféré dans un tube de 2 ml où 1 volume d'isopropanol 100% est ajouté. Les échantillons sont laissés à -20°C pour 30 minutes avant d'être centrifugés de nouveau dans la centrifugeuse à godet balancier à 18000 g, pendant 15 minutes à une température de 4°C . Une fois le surnageant retiré, 500 μl de TE et 10 μl de RNase A (10 mg/ml) sont ajoutés aux culots et les échantillons sont laissés 30 minutes dans un four à 37°C afin de retirer les ARN présents. Suite à la dégradation de l'ARN, 225 μl de 3 M NaOAc et 35 μl de 10 % SDS sont ajoutés avant d'effectuer une séquence d'extraction des protéines par phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et de chloroforme de la même façon que celle décrite précédemment. À la phase aqueuse obtenue, un volume d'isopropanol 100% froid est ajouté et les échantillons furent laissés à -20°C pour au moins

1 h afin de précipiter l'ADN. Ensuite, les tubes ont été centrifugés dans la centrifugeuse à godet balancier tel que décrit précédemment. Le surnageant des échantillons a été retiré et 1 ml d'éthanol 70% fut ajouté au culot, afin retirer les sels pouvant être présents dans les échantillons. Finalement, ils furent centrifugés dans la centrifugeuse à godet balancier pour 10 minutes additionnelles. Le culot d'ADN obtenu fut séché, suite à une inversion des tubes afin de retirer l'éthanol, dans une cuve à vide pour 15 minutes avant l'addition de 100 µl ddH₂O stérile.

Afin évaluer la quantité d'ADN isolée, soit 2 µl de chaque échantillon ont été visualisés sur un gel d'agarose de 0,8%. Par la suite, les échantillons furent digérés avec l'enzyme de restriction *NheI* par l'ajout séquentiel de 11 µl de 10X NEBuffer #2, 1 µl 100x BSA et de 2,5 µl *NheI* (New England BioLabs, Pickering, Ontario) dans les tubes et une incubation à 37°C pour au moins 6 h afin de s'assurer d'une digestion complète, étant donné que les pontages réduisent l'efficacité des digestions enzymatiques. Un nettoyage des échantillons par une séquence d'extraction des protéines par phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et chloroforme, suivi une précipitation de l'ADN fut effectuée tel que décrite précédemment. Suite à la resuspension des échantillons dans 20 µl de tampon de chargement (10% glycerol, 0,05% (p/v) bleu de bromophénol, 0,05% (p/v) xylène cyanol), les échantillons ont été chargés sur un maxi-gel (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, États-Unis) d'agarose 1% dans du tampon 1,2X TAE (Tris-Acetate-EDTA, 48 mM Tris, 24 mM acide acétique et 1,2 mM EDTA) pour une migration de 22 h à 65 V. Après 1 h de migration, une pompe de recirculation (VWR, Mississauga, Ontario) est installée afin de s'assurer que la distribution des électrolytes du tampon reste homogène. Une fois cette migration terminée, l'ADN du gel fut transféré et hybridée sur une membrane de nylon Hybond-XL (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec, Canada) de la même façon que celle décrite dans la section X.4.5. En contrepartie, le marquage de la sonde utilisée pour l'hybridation fut préparé avec les deux oligonucléotides, ciblant le brin transcrit et non-transcrit, qui furent mélangés à un ratio 1:1 avant le marquage tel que décrit précédemment.

4.1.6 Courbes de réparation de la région intergénique de l'ADN ribosomal.

La technique suivante s'apparente à celle décrite dans la section X.4 et fut utilisée afin d'étudier la cinétique de réparation par la machinerie NER dans la zone intergénique présente entre les gènes d'ARNr précurseurs. Cette région, de 2,4 kb, est entièrement nucléosomale, qu'elle soit présente entre des gènes d'ARNr ouverts ou fermés. Conséquemment, cette région est utile afin de contrôler les cinétiques de réparation entre diverses souches au niveau des cinétiques de réparation par la GG-NER.

Dans un premier temps, les cellules furent irradiées et les noyaux préparés tel que décrit dans les sections 4.1.5.1 et 4.1.5.2. Par la suite, six aliquots de 400 µl de noyaux, soit un pour chaque temps de réparation, ont été dégelés sur glace dans une salle ne possédant que des néons fluorescents jaunes (Osram Sylvania, Mississauga, Ontario, Canada) et centrifugés à 9000 g pour 5 minutes dans une centrifugeuse à angle fixe (Microspin 24S Sorvall, Wilmington, DE, États-Unis). Les noyaux étant présents dans le culot, le surnageant fut donc entièrement retiré à l'aide d'une pipette et 500 µl de TE (Tris-EDTA – 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5) a été ajouté. Ensuite, 225 µl d'acétate de sodium 3 M (3 M NaOAc – pH 5,2) et 35 µl de 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ont été ajoutés, de façon séquentielle, en brassant bien les tubes entre chaque addition et en effectuant une légère centrifugation afin de faire descendre l'échantillon dans le fond du tube. Par 2 fois, un volume (environ 770 µl) de phenol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) équilibré au pH 9,8 (à l'aide de 1 M Tris-HCl, pH 9,8) est ajouté à chacun des échantillons. Ceux-ci ont été brassés vigoureusement et centrifugés à 9000 g pour 3 minutes. La phase aqueuse fut récoltée et, afin de bien retirer toute trace de phénol, un volume (environ 770 µl) de chloroforme a été ajouté, centrifugé et la phase aqueuse récupérée une dernière fois. À partir de ce point, la manipulation des échantillons s'est effectuée sous la lumière normale, la photolyase ayant été retirée de l'échantillon grâce aux extractions phénoliques. La précipitation de l'ADN est effectuée par l'ajout d'un volume (environ 760 µl) d'isopropanol 100% froid aux 6 échantillons. Ensuite, ils ont été laissés à -20°C durant 1 h avant d'être centrifugés dans une centrifugeuse à godet balancier à 18000 g pour 20 minutes à 4°C. Suite cette précipitation, le surnageant est retiré par inversion. Afin de

retirer l'ARN, 500 µl de TE a été ajouté, ainsi que 10 µl de RNase A (10 mg/ml) et le tout a été incubé à 37°C pendant une heure. Suite à la dégradation de l'ARN, 225 µl de 3 M NaOAc et 35 µl de 10 % SDS ont été ajoutés avant d'effectuer une séquence d'extraction des protéines par phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et de chloroforme de la même façon que décrit précédemment. L'ADN est à nouveau précipité par l'addition d'un volume d'isopropanol 100% froid à la phase aqueuse obtenue et les échantillons ont été laissés à -20°C pour 1 h avant d'être centrifugés dans la centrifugeuse à godet balancier à nouveau. L'ADN étant présent dans le culot, le surnageant des échantillons a été retiré et 1 ml d'éthanol 70% a été ajouté, afin retirer les sels pouvant être présents dans les échantillons, et ils furent centrifugés de nouveau dans la centrifugeuse à godet balancier pour 10 minutes à 18000 g à 4°C. Le culot d'ADN obtenu fut séché dans une cuve à vide pour 15 minutes avant l'addition de 100 µl H₂O bi-distillée stérile. Une petite quantité d'ADN ainsi isolé, soit 2µl, fut visualisé sur un gel d'agarose de 0,8% afin d'évaluer la quantité d'ADN isolée et d'égaliser les quantités pour l'expérience de T4-endonucléase-V.

La libération du fragment de la région intergénique fut accomplie par l'ajout de 11 µl de 10X NEBbuffer *EcoRI* et de 2,5 µl *EcoRI* (New England BioLabs, Pickering, Ontario) aux échantillons. Après une incubation à 37°C d'au moins 6h, 100 µl de TE fut ajouté et les protéines furent retirés par une extraction à l'aide de 200 µl phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) suivi d'un chloroforme tel que présenté précédemment. Par la suite, 20 µl de 3 M NaOAc ont été ajoutés et les échantillons ont été mélangés avant l'ajout de 550 µl 100% éthanol froid. Suite à une incubation de 20 minutes à -80°C, ces 6 tubes sont centrifugés à 18'000 g dans la centrifugeuse à godet balancier à une température de 4°C pour 20 minutes. Ensuite, les surnageants sont retirés par inversion des tubes, 1 ml d'éthanol 70% est ajouté avant une seconde ronde de centrifugation de 10 minutes. Les culots sont séchés dans une cuve à vide, pour environ 15 minutes, avant l'addition de 34 µl tampon de réaction T4 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, pH 8.0). Finalement, la réaction de T4-endonucléase-V fut effectuée telle que définie dans la section 4.1.5.4 et le gel tel que décrit dans la section 4.1.5.5 Par contre, la migration ne s'est déroulée que sur 5 h à 55 V sur un gel de type « midi » (« *Easy-Cast Electrophoresis System* », model #B2, Owl Scientific Inc. Rochester, NY. États-Unis) et la sonde utilisée pour l'hybridation fut

préparée avec 2 oligonucléotides ciblant la région intergénique qui furent mélangés à un ratio 1:1 avant le marquage (NTS2-AF : 5'-GGA GGG ACG GTT GAA AGT GGA CAG-3' et NTS2-AR : 5'-CCC ACC ACA CTC CTA CCA ATA ACG G-3') tel que recommandé par le fabricant. La quantification fut effectuée de la même façon que celle préalablement décrite dans la section 4.1.5.6.

4.1.7 Évaluation de la structure de la chromatine de l'ADN ribosomal par photo-pontage au triméthylpsoralène.

Le photo-pontage au triméthylpsoralène tel qu'effectué dans notre laboratoire découle initialement des travaux du laboratoire du Dr. Sogo (Conconi *et al.*, 1989). Un rappel historique du développement de la technique a été publié par notre laboratoire (Toussaint *et al.*, 2005) et cette technique est utilisée de façon routinière par les membres de notre groupe de recherche (Conconi *et al.*, 2005). La structure de l'ADNr fut donc évaluée par la méthode suivante : une fois les cellules irradiées aux rayons UVc et les noyaux préparés tel que le décrivent les sections 4.1.5.1 et 4.1.5.2, 400 µl de ces derniers furent dégelés sur glace. À ces noyaux dégelés, 400 µl de NIB fut rajouté (pour un volume total de 800 µl) et le photo-pontage au triméthylpsoralène fut effectué tel que décrit dans la section 4.1.5.7. La quantification fut effectuée en évaluant l'intensité relative des 2 populations d'ADNr (ouverts, retardés sur gel, et fermés, moins retardés sur gel, figure 27) dans le logiciel d'analyse d'imagerie ImageQuant 5.0 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Québec, Canada).

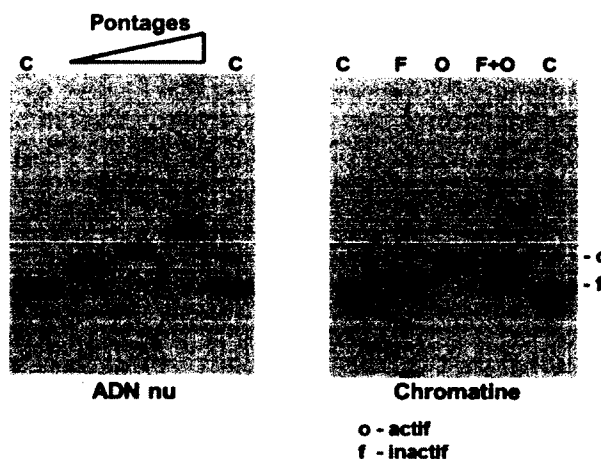


Figure 27: Principe du photo-pontage au triméthylpsoralène pour évaluer la structure de la chromatine de l'ADNr. Sur de l'ADN nu, plus le photo-pontage au triméthylpsoralène aura été effectué, plus l'ADN photo-ponté (ligne verte) sera retardé lors d'une migration sur gel lorsque comparé à de l'ADN contrôle (ligne noire) n'ayant pas été photo-ponté (puits « C »). Lorsque le photo-pontage est effectué sur des préparations nucléaires, l'ADNr fermé accumulera peu de photo-pontage, dû à l'action inhibitrice des nucléosomes, et sera donc peu retardé sur gel, par rapport à l'ADN contrôle (comparez les puits « C » et « F »). En contrepartie, l'ADNr ouvert accumulera plus de photo-pontages et sera donc plus retardé sur gel (puits « C » et « O »). Dans un contexte réel, puisque les deux populations coexistent dans la levure *S. cerevisiae*, ces deux populations seront visibles dans des bandes distinctes (puits « F+O »).

4.2 Résultats

4.2.1 Analyse de l'impact d'une délétion de *RAD16* sur la cinétique de réparation des dommages induits par les rayons UV au niveau de l'ADNr.

Afin de clarifier l'impact du complexe Rad7/16-Abf1p sur la réparation NER au niveau des 2 populations d'ADNr, des analyses de cinétique de réparation des dommages induits par les rayons UV furent entamées. L'avantage de notre technique d'analyse est celui de pouvoir séparer ces 2 populations afin de pouvoir clairement identifier le rôle du complexe. Si l'hypothèse du groupe de recherche du Dr. Brouwer est bonne, la délétion du gène *RAD16* affectera négativement la réparation de l'ADNr nucléosomal, mais n'affectera pas la réparation de l'ADNr non-nucléosomal (voir la section 1.5.3.3 pour plus de détails).

4.2.1.1 Vérification phénotypique de la souche JS-*rad16*Δ

Avant de débiter les analyses de cinétiques de réparation suite à l'induction de dommages causés par les rayons UV, nous avons choisi de vérifier phénotypiquement la sensibilité de JS-*rad16*Δ par la technique de suivi des courbes de croissance afin de confirmer l'absence du gène. En fait, une confirmation précise de l'absence de *RAD16*, par l'analyse du patron de digestion de l'ADN génomique au niveau de la région de *RAD16*, fut effectuée par un ancien étudiant du laboratoire. Étant donné que la sensibilité de cette souche est reconnue comme modérée et que son phénotype fut préalablement publié par notre laboratoire (Toussaint *et al*, 2006), il est possible de confirmer l'absence du gène *RAD16* par l'observation des courbes de croissance suite à l'exposition aux rayons UV. Les cellules de type sauvage (JS311), JS-*rad33*Δ, JS-*rad34*Δ et JS-*rad16*Δ furent cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance, puis irradiées à des doses de 50 et 150 J/m² pour être ensuite remises en culture dans du milieu frais pour l'analyse des courbes de croissance sur une durée de 48 heures présentée à la figure 28A.

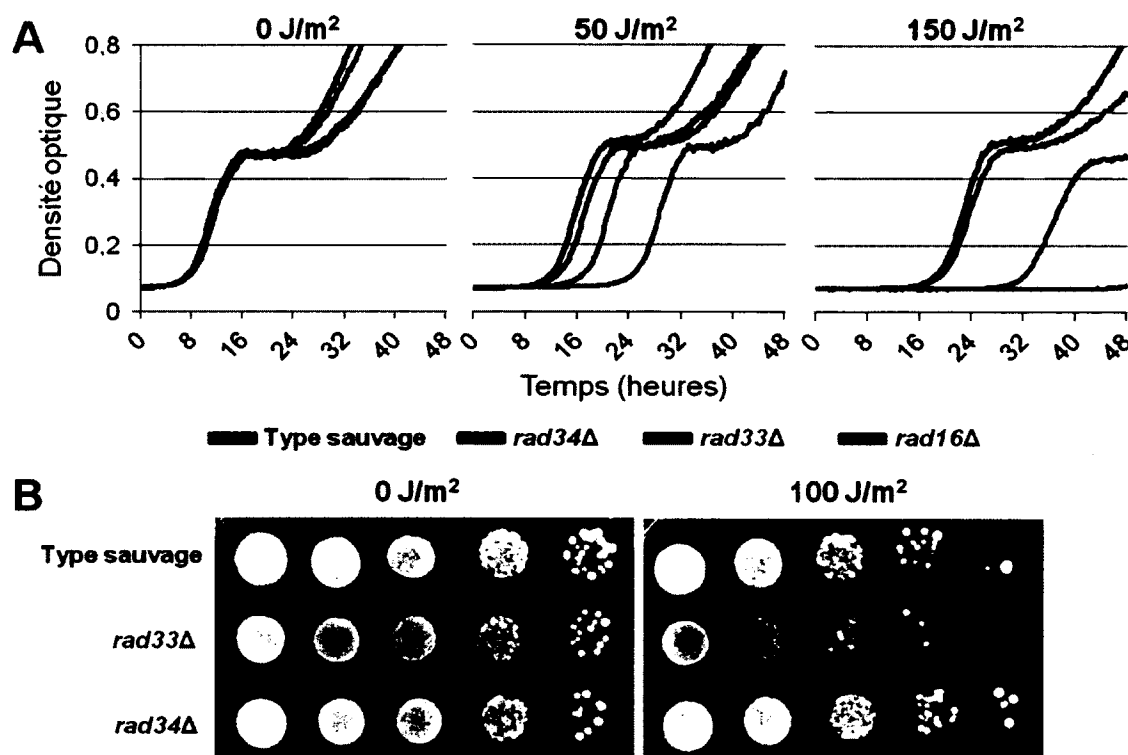


Figure 28 : Analyses de sensibilité des souches JS311, JS-*rad34Δ*, JS-*rad33Δ* et JS-*rad16Δ* aux rayons UV. (A) La sensibilité aux rayons UV, aux doses de 0, 50 et 150 J/m², fut analysée par la méthode des courbes de croissances pour confirmer le phénotype de sensibilité UV des souches JS-*rad16Δ* et JS-*rad33Δ* ainsi que pour définir la sensibilité aux UV de la souche JS-*rad34Δ* par rapport à la souche contrôle JS311 (type sauvage). (B) Test de sensibilité aux rayons UV des souches JS311 (type sauvage), JS-*rad33Δ* et JS-*rad34Δ* sur plaque de milieu de culture YeP + 2% glucose face à une exposition de 100 J/m² présenté à titre d'exemple.

Dans cet essai, la souche de type sauvage sert de point de référence au niveau de la sensibilité aux rayons UV. Conséquemment, une souche d'intérêt présentant une croissance retardée par rapport au type sauvage, suite à une irradiation, sera considérée comme sensible et, à l'inverse, une souche ayant une courbe de croissance moins retardée que le type sauvage sera considérée comme résistante. Finalement, lorsque la croissance suite à l'induction de dommage est équivalente au type sauvage, cette souche est considérée comme normale.

Au-delà du type sauvage, deux contrôles sont présents :

- Contrôle négatif: Les courbes de croissance de *JS-rad34Δ* (courbes vertes, figure 28A), où le gène encodant pour une protéine impliquée au niveau de la TC-NER des gènes ribosomaux est absent (voir chapitre 1), sont superposées à toutes les doses, ce qui confirme l'absence de sensibilité aux rayons UV chez cette souche.
- Contrôle positif: Les courbes de croissance de *JS-rad33Δ* (courbes bleues, figure 28A), où le gène encodant pour une protéine membre des complexes RAD4 et RAD34, sont superposées lorsqu'il n'y a pas d'irradiation. Toutefois, dès 50 J/m^2 , un retard d'environ 8h est observable par rapport au type sauvage. Ce retard de croissance augmente à près de 16hres suite à une exposition de 150 J/m^2 . Il est intéressant de noter que la sensibilité de *rad33Δ* est connue comme étant très légère et relativement difficile à observer lors d'analyses sur plaques de pétris à des doses inférieures à 100 J/m^2 (figure 28B). La technique des courbes de croissance, utilisée par notre laboratoire, démontre bien son efficacité, puisque la sensibilité de *JS-rad33Δ* est observable à 50 J/m^2 (figure 28A).

Finalement, la croissance de *JS-rad16Δ* (courbe rouge, figure 28A) a pu être comparée à celle des contrôles afin d'en évaluer la sensibilité. Premièrement, la croissance de cette souche s'effectue normalement avant une exposition aux UV, puisque la courbe de croissance est superposée à celle du type sauvage. Par contre, il appert qu'une irradiation de 50 J/m^2 retarde la croissance d'environ 16hres chez *JS-rad16Δ* et empêche toute croissance à la dose de 150 J/m^2 . Ce retard est plus important que celui du contrôle de faible sensibilité aux UV qui était de 8hres à 50 J/m^2 et de 16 heures à 150 J/m^2 . Ce phénotype de retard de croissance est conséquent avec la délétion du gène *RAD16* tel qu'observé préalablement par les travaux de Martin Toussaint (Toussaint *et al*, 2006). Par conséquent, les expériences d'analyses des cinétiques de réparation peuvent être entamées.

4.2.1.2 Analyse de la cinétique de réparation de l'ADNr chez la souche JS-*rad16Δ*

Suite à la confirmation phénotypique de la souche, les cellules furent mises en culture jusqu'en phase exponentielle de croissance avant d'être irradiées à une dose d'UV permettant la formation d'un dimère de CPD par Kb par brin d'ADN pour être remises dans du milieu de culture frais afin de permettre aux cellules de réparer les dommages à l'ADN. Suite à la collecte des divers échantillons aux temps de réparation définis, les noyaux furent préparés afin de pouvoir effectuer la libération de l'ADNr actif. Par la suite, l'ADN fut isolé, digéré par *NheI*, afin de relâcher l'ADNr inactif, et séparé également en 2 aliquotes. L'un d'eux a été digéré avec l'endonucléase V du phage T4 afin d'effectuer une coupure simple-brin en 5' au niveau des dommages CPD et l'autre n'est pas mis en présence de cette enzyme. Par la suite, les échantillons sont chargés sur un gel dénaturant afin de séparer les bandes d'intérêt, transférés sur une membrane par buvardage de type Southern et hybridés avec une sonde spécifique au brin transcrit ou non-transcrit de l'ADNr. Un résultat type pour chacun des brins hybridé est présenté en figure 30A et les quantifications finales en figure 30B. De plus, les courbes de cinétique de réparation d'une souche de type sauvage provenant de la même souche mère (JS311), présentés dans le chapitre 1, sont reprises à la figure 29 afin de permettre une comparaison rapide de JS-*rad16Δ* par rapport à JS311. Il est important de mentionner que l'irradiation et le suivi des cinétiques de réparation chez JS311 furent effectués de la même manière que chez la souche JS-*rad16Δ*.

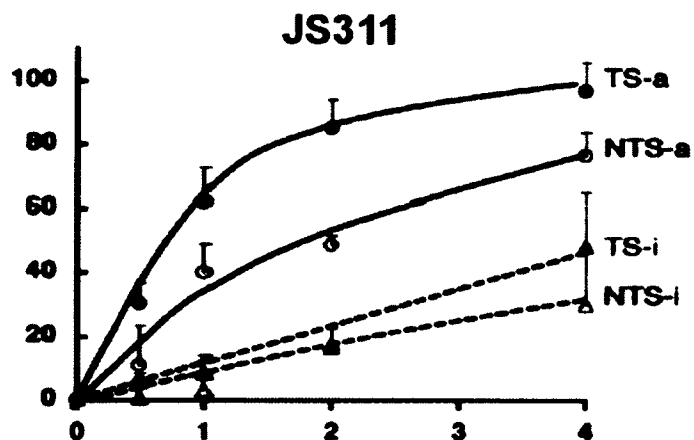


Figure 29 : Cinétique de réparation de l'ADNr de la souche de type sauvage JS311. Ce graphique provient du chapitre 1 et est présenté de nouveau dans ce chapitre. En abscisse, le pourcentage de réparation et le temps de réparation en ordonnée. La cinétique de réparation de l'ADNr actif (lignes pleines - cercles) et inactif (lignes pointillées - triangles) sont présentées, autant pour les brins transcrits (foncé) que non transcrits (blancs). Référez-vous au chapitre 1, figure 2 pour de plus amples détails.

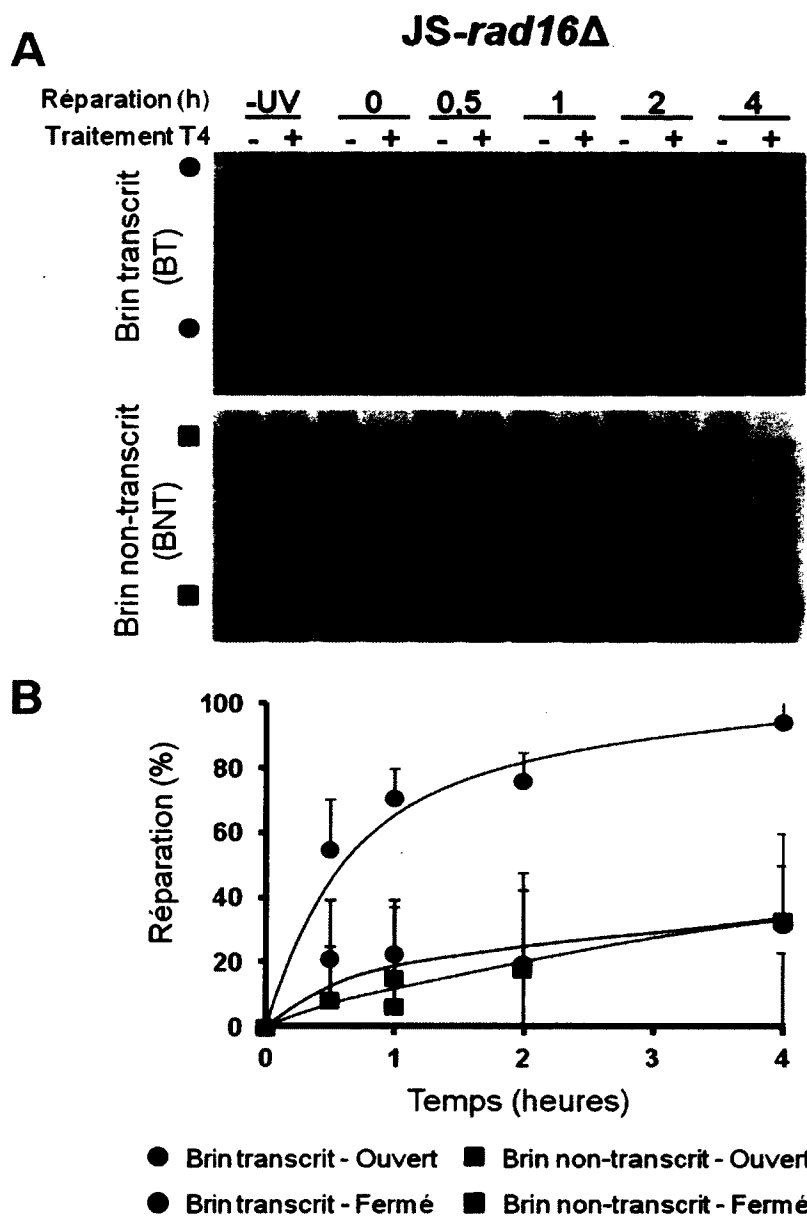


Figure 30 : Courbes de réparation de l'ADNr de JS-*rad16*Δ. (A) Résultat type, suite à l'irradiation de la souche JS-*rad16*Δ. Les 2 bandes d'intérêt de chaque gel sont identifiées par un cercle, pour les résultats du brin transcrit (BT) ou d'un carré, pour les résultats du brin non-transcrit (BNT). En rouge, l'ADNr fermé, d'une taille de 4,4 kb et, en vert, l'ADNr ouvert, de 2,9 kb. (B) Courbes de réparation pour l'ADNr séparé, les barres d'erreurs correspondent à 4 expériences pour le BT et de 5 expériences pour BNT.

Tableau 5 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de JS-*rad16*Δ. Moyenne de 4 expériences et de 5 pour le BT et BNT respectivement.

Temps (h)	BT - Ouvert	BT - Fermé	BNT - Ouvert	BNT - Fermé
0	0	0	0	0
0,5	54,8 ± 15,3	8,2 ± 13,8	21,3 ± 17,7	8,1 ± 16,5
1	70,8 ± 8,8	15,1 ± 21,6	22,8 ± 16,4	6,3 ± 15,7
2	78,0 ± 8,5	17,6 ± 20,7	19,8 ± 22,4	3,0 ± 21,0
4	94,4 ± 9,1	33,0 ± 26,6	31,7 ± 18,0	-2,8 ± 25,6

Dans un premier temps, si l'on décrit les cinétiques de réparation obtenues pour les cellules JS-*rad16* Δ au niveau de l'ADNr ouvert :

- La réparation du brin transcrit ouvert s'effectue de façon similaire à la souche de type sauvage. Par exemple, après 1 heure de réparation, environ 70% des dommages furent réparés dans ces deux souches et la réparation est complète après 4h. Ce résultat est conséquent avec l'hypothèse émise précédemment que le complexe Rad7/16-Abf1p n'est pas nécessaire au niveau de l'ADNr non-nucléosomal.
- À l'inverse, la réparation du brin non-transcrit ouvert est très fortement affectée lors de la délétion de *RAD16*. Par exemple, ce brin est réparé à environ 20% après 1h chez JS-*rad16* Δ et à 40% chez JS311. Malgré les écarts-types importants, il est possible d'observer clairement que la réparation est faible dans cette région. Cette observation semble aller contre l'hypothèse du groupe du Dr. Brouwer, étant donné que le brin non-transcrit ouvert ne possède pas de nucléosomes canoniques et que le complexe Rad7/16-Abf1p ne devrait pas être requis.

Dans un second temps, si l'on observe les cinétiques de réparation obtenues pour les cellules JS-*rad16* Δ au niveau de l'ADNr fermé, il est possible de remarquer que :

- Au niveau du brin transcrit fermé, la réparation est ralentie. Malgré l'importance des écarts-types, il est possible d'affirmer que la réparation est plus lente chez JS-*rad16* Δ par rapport au type sauvage. Par exemple, jusqu'à 2h, tous les points de réparation analysés croisent de façon importante l'abscisse (donc 0% de réparation). À 4h, il est possible d'observer une réparation de 33% en moyenne par rapport à presque 50% chez le type sauvage.
- Au niveau du brin non-transcrit fermé, aucune réparation n'est discernable chez JS-*rad16* Δ .

Ces résultats, de façon globale, appuient la thèse évoquant que le complexe Rad7/16-Abf1p est nécessaire afin de permettre la réparation de l'ADNr nucléosomal inactif. Par contre, l'impact d'une délétion de *RAD16* au niveau du brin non-transcrit actif, n'étant pas sous forme nucléosomale, vient contredire cette hypothèse ou, du moins, la complexifier. Selon le modèle présenté à la figure 24, le complexe Rad7/16-Abf1p est nécessaire afin de permettre une acétylation des queues des histones suite à l'induction de dommages UV. Cette acétylation créerait une chromatine plus ouverte et dynamique, ce qui augmenterait l'accessibilité aux dommages par la machinerie de la GG-NER afin d'en effectuer la réparation. Il est donc capital d'évaluer si le complexe Rad7/16-Abf1p est seulement impliqué au niveau de l'acétylation des histones afin de permettre une réparation efficace au niveau de l'ADNr ou s'il possède une activité additionnelle telle que semble l'indiquer les observations au niveau du brin non-transcrit de l'ADNr ouvert présentées ici.

4.2.2 Analyse de l'impact d'une hyperacétylation sur la cinétique de réparation des dommages induits par les rayons UV au niveau de l'ADNr.

Considérant que le complexe Rad7/16-Abf1p cause une augmentation de l'acétylation des queues des histones suite à une irradiation aux rayons UV et que cette acétylation permettrait un meilleur accès aux dommages par la machinerie NER, une analyse de la réparation du locus ribosomal hyperacétylé est en mesure d'apporter des informations supplémentaires. En fait, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'une hyperacétylation constitutive des histones au niveau de l'ADNr causerait une meilleure réparation de l'ADNr nucléosomal et n'affecterait pas la réparation au niveau de l'ADNr ouvert (et non-nucléosomal). Tel que mentionné dans la section 1.3.5, il est possible d'augmenter de 3 à 5 fois l'acétylation du locus de l'ADNr par la délétion du gène *SIR2*. Conséquemment, il est important d'effectuer une série d'expériences préliminaires afin de contrôler l'impact de la délétion de *SIR2* sur la réparation de l'ADNr avant d'effectuer une double délétion de *SIR2* et *RAD16* afin d'évaluer cette hypothèse.

4.2.2.1 Analyse de cinétique de réparation de l'ADNr chez la souche JS343 (*sir2* Δ)

La souche JS343, descendant de la souche de type sauvage JS311, fut traitée de la même manière que la souche JS-*rad16* Δ afin de faciliter la comparaison de leurs cinétiques de réparation. À première vue, la réparation de l'ADNr s'effectue plus rapidement chez une souche *sir2* Δ que chez une souche de type sauvage (figure 31B). Au-delà du brin transcrit ouvert, réparé à une vitesse très égale à celle du type sauvage, les autres brins, qu'ils soient ouverts ou fermés, sont réparés plus rapidement.

L'augmentation de la vitesse de réparation la plus mitigée s'effectue du côté du brin non-transcrit ouvert : ce dernier est réparé à un niveau de 70% après 2h par rapport à 50% chez le type sauvage. L'impact de la délétion de *SIR2* est encore plus grand au niveau de l'ADNr fermé : les brins fermés sont maintenant réparés à une vitesse égale aux brins correspondants ouverts (moyennes et écarts-types se chevauchent, tableau 6). En résumé, chez la souche *sir2* Δ , les brins transcrits (actifs et inactifs) sont réparés selon une cinétique identique, tout comme les brins non-transcrits (actifs et inactifs) entre-eux au niveau de cette souche.

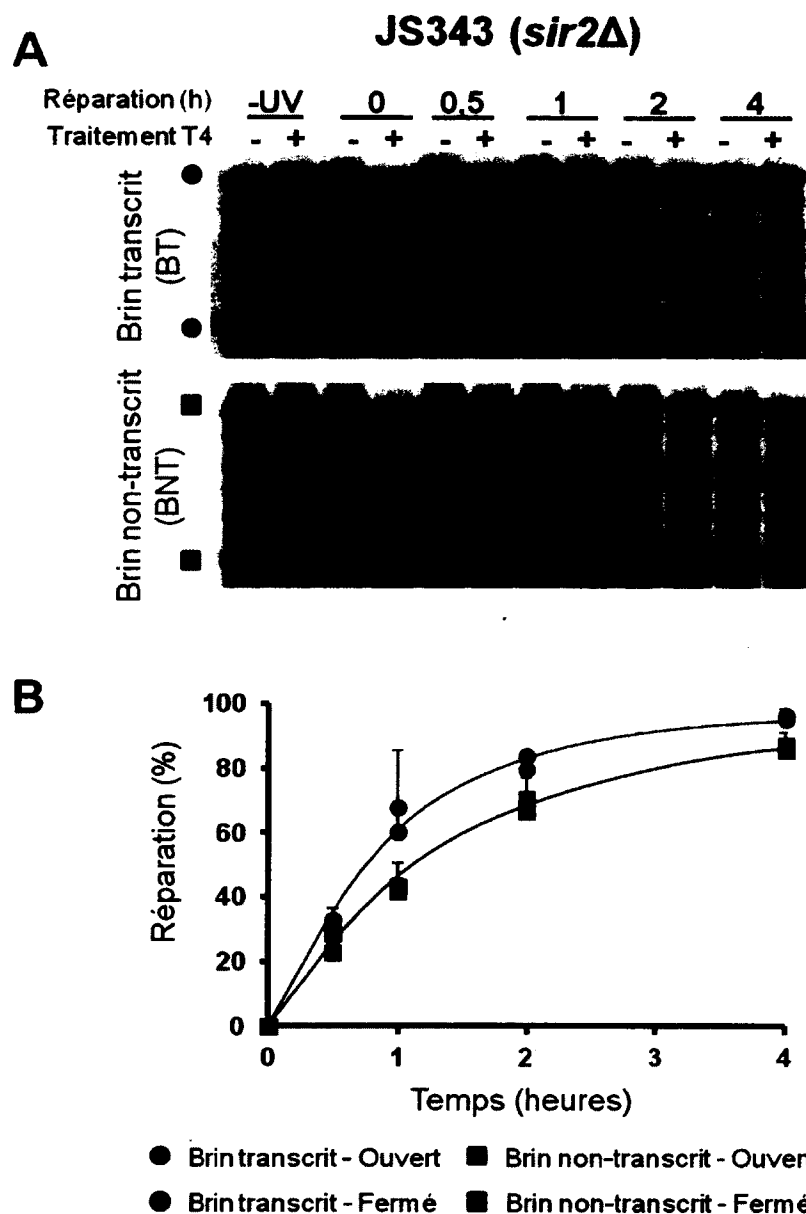


Figure 31 : Courbes de réparation de l'ADNr de JS343 (*sir2Δ*). (A) Résultat type, suite à l'irradiation de la souche JS343 (*sir2Δ*). Les 2 bandes d'intérêt de chaque gel sont identifiées par un cercle, pour les résultats du brin transcrit (BT) ou d'un carré, pour les résultats du brin non-transcrit (BNT). En rouge, l'ADNr fermé, d'une taille de 4,4 kb et en vert, l'ADNr ouvert, de 2,9 kb. (B) Courbes de réparation pour l'ADNr séparé, les barres d'erreurs correspondent à 3 expériences pour le BT et de 3 expériences pour le BNT.

Tableau 6 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de JS343 (*sir2Δ*). Moyenne de 3 expériences pour le BT et BNT.

Temps (h)	BT - Ouvert	BT - Fermé	BNT - Ouvert	BNT - Fermé
0	0	0	0	0
0,5	27,4 ± 4,2	32,4 ± 3,7	22,5 ± 5,2	24,3 ± 1,7
1	67,7 ± 17,8	60,3 ± 6,3	41,7 ± 8,8	43,3 ± 2,4
2	79,5 ± 2,2	83,8 ± 1,8	70,2 ± 6,7	68,6 ± 2,8
4	95,0 ± 3,5	96,3 ± 1,1	87,2 ± 3,9	85,4 ± 2,5

Ces résultats peuvent s'expliquer de trois façons. Il est possible que l'augmentation de l'acétylation causée par la délétion de *SIR2* entraîne une meilleure accessibilité aux dommages causés par les rayons UV, ce qui expliquerait les cinétiques de réparation plus rapides observées. Par contre, chez *sir2Δ*, l'inhibition des sites cryptiques de transcription par la polymérase à ARN II et des sites E-pro est résiliée. En conséquence, la réparation plus rapide chez *sir2Δ* pourrait s'expliquer par une augmentation de la TC-NER due à la transcription de la polymérase à ARN II dans le locus des gènes de l'ARNr. De plus, il est possible que la délétion de *SIR2*, causant une augmentation de la recombinaison homologe dans l'ADNr par l'entremise de la transcription des sites E-pro, ait un rôle à jouer au niveau de la réparation chez *sir2Δ*.

4.2.2.2 Analyse de cinétique de réparation de l'ADNr chez la souche BY4741

Étant donné que les analyses subséquentes furent effectuées à partir d'une nouvelle souche mère, il a été nécessaire de répéter ces analyses sur cette nouvelle souche mère. Encore une fois, les levures furent exposées aux mêmes doses de rayons UV et manipulations que les souches précédentes. Chez cette souche, la réparation de l'ADNr ouvert est plus lente par rapport à la souche mère antérieure, JS311 (Figure 32B et tableau 7). En effet, après 1 heure de réparation, le BT ouvert est réparé à 40% chez BY4741 comparativement à 60% chez JS311. Après 4 heures, la réparation est à 90% dans ces deux souches mères. De façon similaire, la réparation du BNT ouvert est aussi diminuée par rapport à la souche JS311 : elle est de près de 20% après 1 heure chez BY4741 par rapport à 40% chez JS311. Encore une fois, les différences sont négligeables au point final de réparation analysé. À l'opposé, la réparation de l'ADNr fermé semble légèrement plus rapide dans cette souche. En moyenne, l'ADNr fermé de BY4741 semble être réparé à 20% après 1 heure, comparativement à 2 heures chez JS311. De plus, la réparation est effectuée à 60% après 4 heures chez BY4741 comparativement à 40%, en moyenne, chez JS311. Globalement, les phénomènes observés chez JS311 (soit la TC-NER du BT ouvert et la réparation plus efficace du BNT ouvert) sont encore présents dans cette nouvelle souche mère qui a servi de type sauvage pour les expériences présentées subséquemment.

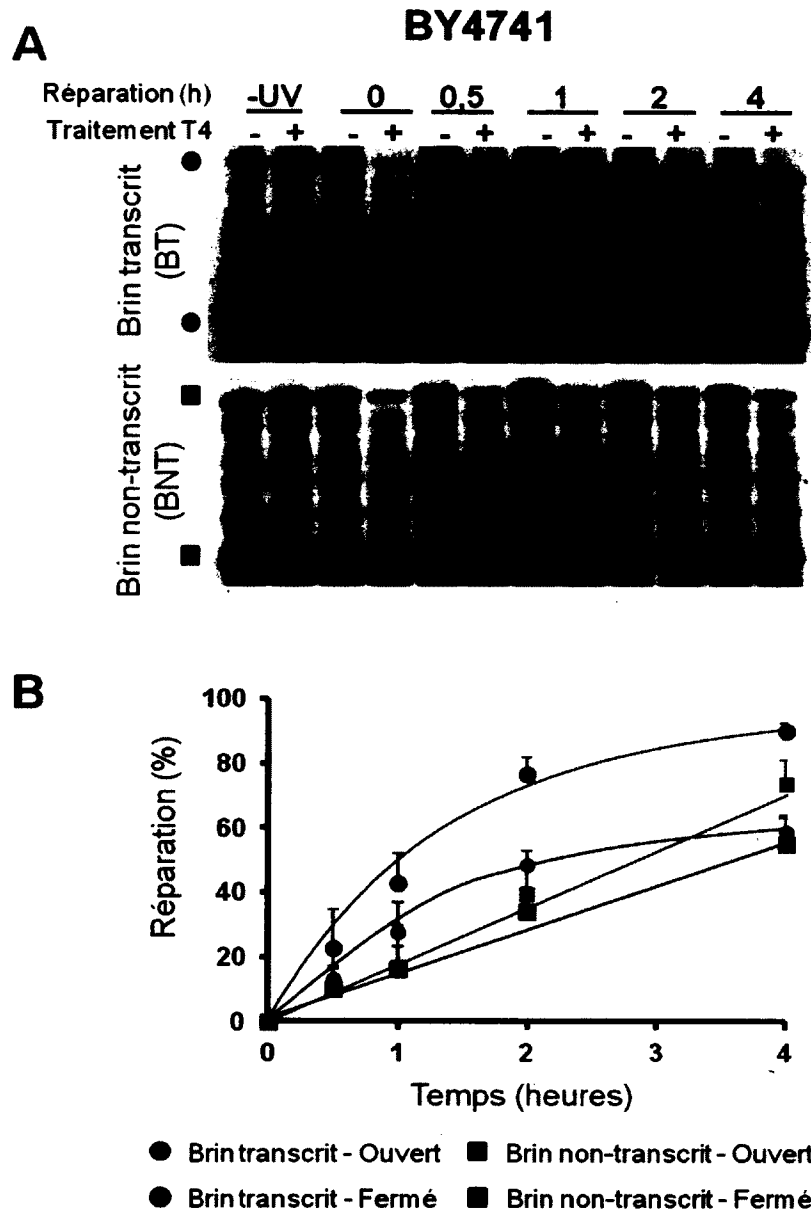


Figure 32 : Courbes de réparation de l'ADNr de BY4741. (A) Résultat type, suite à l'irradiation de la souche BY4741. Les 2 bandes d'intérêt de chaque gel sont identifiées par un cercle, pour les résultats du brin transcrit (BT) ou d'un carré, pour les résultats du brin non-transcrit (BNT). En rouge, l'ADNr fermé, d'une taille de 4,4 kb et en vert, l'ADNr ouvert, de 2,9 kb. (B) Courbes de réparation pour l'ADNr séparé, les barres d'erreurs correspondent à 5 expériences pour le BT et de 6 expériences pour le BNT.

Tableau 7 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de BY4741. Moyenne de 5 et 6 expériences, respectivement, pour le BT et BNT.

Temps (h)	BT - Ouvert	BT - Fermé	BNT - Ouvert	BNT - Fermé
0	0	0	0	0
0.5	22.6 ± 12.3	13.0 ± 8.3	9.6 ± 7.6	10.1 ± 6.5
1	42.9 ± 9.2	27.7 ± 9.1	17.1 ± 12.8	16.2 ± 7.0
2	76.6 ± 5.1	48.4 ± 4.3	39.5 ± 9.0	34.1 ± 7.5
4	89.9 ± 2.5	58.7 ± 4.6	73.5 ± 7.6	54.9 ± 8.9

4.2.2.3 Analyse de cinétique de réparation de l'ADNr chez la souche BY-*rad26*Δ

Malgré les observations précédentes de notre laboratoire démontrant que RAD26 n'était pas impliqué au niveau de la réparation du locus de gènes de l'ARNr (voir chapitre 1, figure 5), il a été nécessaire d'effectuer une analyse des cinétiques de réparation au niveau de l'ADNr séparé avant d'effectuer l'analyse chez une souche de double délétion SIR2 et RAD26. La nécessité d'effectuer un tel contrôle s'explique du fait qu'une analyse poussée de l'impact d'une délétion de *RAD26* par séparation des 2 populations d'ADNr n'avait jamais été effectuée précédemment. À titre de rappel, le produit du gène *RAD26* est impliqué au niveau de la TC-NER des gènes transcrits par la polymérase à ARN II. Encore une fois, les cellules furent traitées de la même façon qu'antérieurement. Les résultats sont présentés à la figure 33. Généralement, les résultats de cette souche ne diffèrent pas de façon significative par rapport à celle de la souche mère BY4741. Cela s'explique par la présence de *SIR2* inhibant les sites d'initiation de la transcription par la polymérase à ARN II. Par contre, une légère différence au niveau de la réparation peut être observée au niveau du BNT fermé, qui semble réparé légèrement moins rapidement que chez la souche sauvage (Tableau 8). Toutefois, lorsque les écarts-types sont considérés, cette différence ne semble pas significative, puisque, de tous les points de réparation analysés, seul le point 4 heures diffère de 3,7%. En conclusion, ces résultats démontrent que *RAD26* n'est pas nécessaire au niveau de la réparation de l'ADNr.

Tableau 8 : Tableau comparatif de résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr du type sauvage et de BY-*rad26*Δ au niveau du BNT fermé.

Temps (h)	BY4741	BY- <i>rad26</i> Δ
0	0	0
0,5	10,1 ± 6,5	4,8 ± 3,6
1	16,2 ± 7,0	9,7 ± 6,8
2	24,1 ± 7,5	21,5 ± 6,9
4	54,9 ± 8,9	38,0 ± 4,3

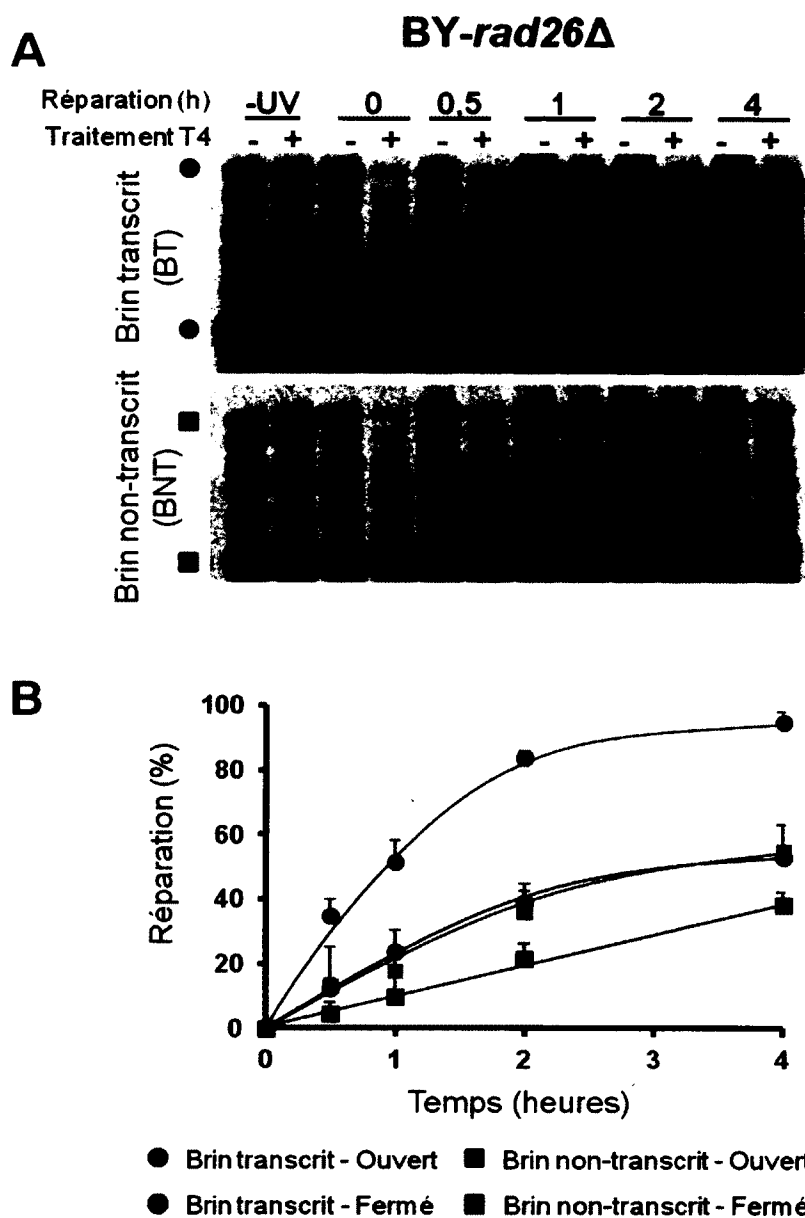


Figure 33 : Courbes de réparation de l'ADNr de BY-*rad26*Δ. (A) Résultat type, suite à l'irradiation de la souche BY-*rad26*Δ. Les 2 bandes d'intérêt de chaque gel sont identifiées par un cercle, pour les résultats du brin transcrit (BT) ou d'un carré, pour les résultats du brin non-transcrit (BNT). En rouge, l'ADNr fermé, d'une taille de 4,4 kb et en vert, l'ADNr ouvert, de 2,9 kb. (B) Courbes de réparation pour l'ADNr séparé, les barres d'erreurs correspondent à 4 expériences pour le BT et de 5 expériences pour le BNT.

Tableau 9 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de BY-*rad26*Δ. Moyenne de 4 et 5 expériences, respectivement, pour le BT et BNT.

Temps (h)	BT - Ouvert	BT - Fermé	BNT - Ouvert	BNT - Fermé
0	0	0	0	0
0.5	34,7 ± 5,4	13,2 ± 11,9	12,3 ± 2,9	4,5 ± 3,5
1	51,5 ± 6,7	17,6 ± 3,8	23,8 ± 6,7	9,7 ± 6,8
2	83,8 ± 2,2	35,7 ± 6,8	38,9 ± 5,9	21,5 ± 5,0
4	94,6 ± 3,6	55,0 ± 8,0	53,1 ± 9,8	38,0 ± 4,3

4.2.2.4 Analyse de cinétique de réparation de l'ADNr chez BY-*sir2Δ rad26Δ*.

Étant donné qu'il est possible que le phénotype de plus grande réparation chez une souche *sir2Δ* peut potentiellement s'expliquer par une transcription par la pARN-II, il est critique d'effectuer l'analyse des cinétiques de réparation avec une souche où la TC-NER liée à la pARN-II est absente. Les analyses furent donc entamées chez la souche BY-*sir2Δ rad26Δ* en utilisant la même méthode que précédemment. Les résultats sont présentés en figure 34. Les résultats observés sont très similaires à ceux observés chez la souche JS343 (*sir2Δ*) et ce, malgré la différence au niveau de la souche mère et de la délétion additionnelle de *RAD26*. Le BT ouvert est réparé selon une cinétique identique à celle d'une souche *sir2Δ*. De plus, chez la souche de double délétion, les BNT sont réparés de façon similaire, tout comme chez la souche de délétion simple *sir2Δ*. Il est possible d'observer une différence au niveau de la réparation du BT fermé chez la souche BY-*sir2Δ rad26Δ*. En effet, chez JS343 (*sir2Δ*), les BT, qu'ils soient fermés ou ouverts, sont réparés selon la même cinétique. À l'opposé, la souche BY-*sir2Δ rad26Δ* semble présenter une réparation plus lente du BT fermé par rapport à JS343 (*sir2Δ*). Toutefois, cette faible différence (de l'ordre d'au plus de 10%) peut s'expliquer par la différence des souches mères, considérant que la réparation varie légèrement entre ces deux souches. Étant donné que la délétion de *RAD26* chez une souche *sir2Δ* ne modifie pas significativement le phénotype observé, il est raisonnable d'affirmer que l'augmentation de la réparation de l'ADNr causé par la délétion de *SIR2* n'est pas causée par une TC-NER dépendante de la pARN-II. De plus, malgré la délétion de *SIR2*, la transcription par la polymérase à ARN II semble très faible dans les régions analysées, puisque la délétion de *RAD26* ne diminue pas les cinétiques observées de façon significative.

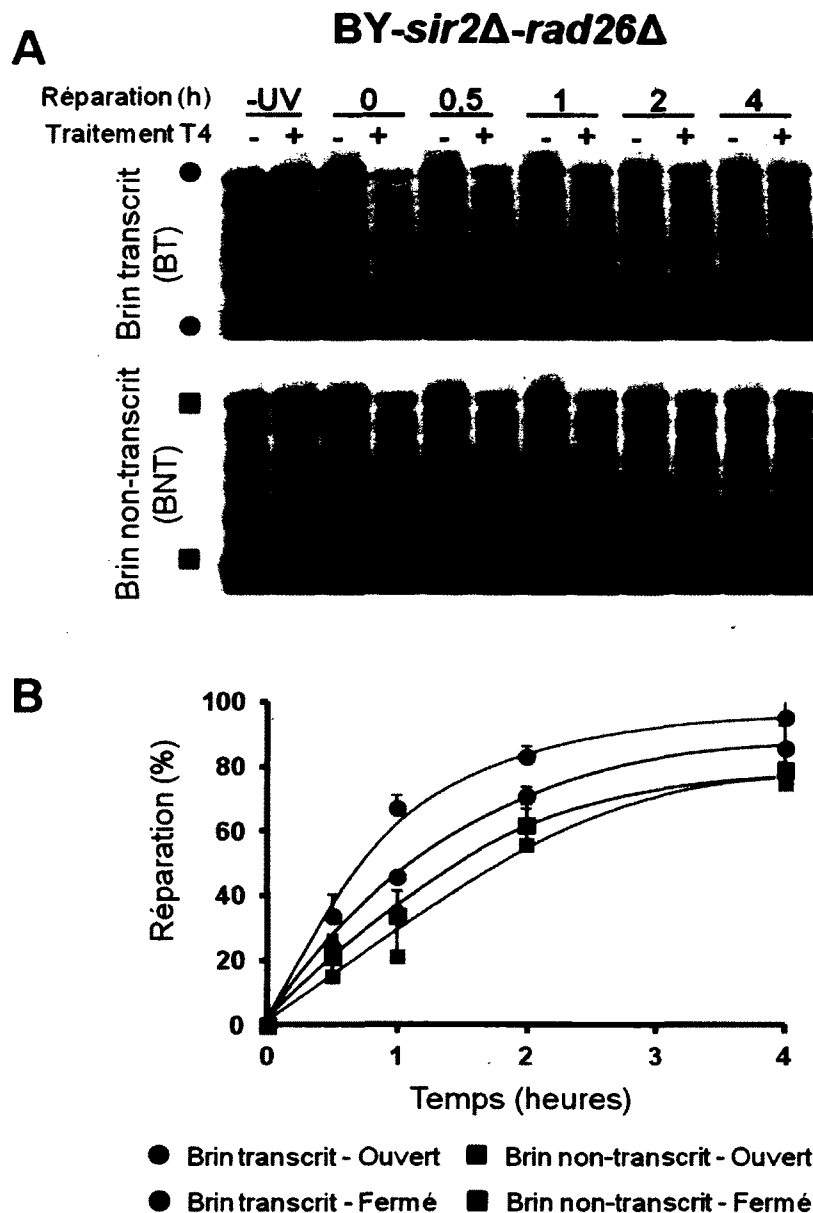


Figure 34 : Courbes de réparation de l'ADNr de BY-*sir2Δ-rad26Δ*. (A) Résultat type, suite à l'irradiation de la souche de BY-*sir2Δ-rad26Δ*. Les 2 bandes d'intérêt de chaque gel sont identifiées par un cercle, pour les résultats du brin transcrit (BT) ou d'un carré, pour les résultats du brin non-transcrit (BNT). En rouge, l'ADNr fermé, d'une taille de 4,4 kb et en vert, l'ADNr ouvert, de 2,9 kb. (B) Courbes de réparation pour l'ADNr séparé, les barres d'erreurs correspondent à 3 expériences pour le BT et de 5 expériences pour le BNT.

Tableau 10 : Tableau des résultats de la cinétique de réparation de l'ADNr de BY-*sir2Δ-rad26Δ*. Moyenne de 3 et 5 expériences, respectivement, pour le BT et BNT.

Temps (h)	BT - Ouvert	BT - Fermé	BNT - Ouvert	BNT - Fermé
0	0	0	0	0
0,5	33,8 ± 6,6	23,6 ± 4,3	14,9 ± 11,3	21,3 ± 5,7
1	66,9 ± 4,1	45,8 ± 0,5	21,3 ± 15,3	33,6 ± 8,0
2	82,9 ± 3,4	70,9 ± 2,9	55,8 ± 11,0	61,5 ± 6,9
4	94,9 ± 7,1	85,4 ± 7,3	74,5 ± 6,9	78,8 ± 7,6

4.2.3 Analyse de l'impact de la délétion de *SIR2* sur la structure de la chromatine.

Il existe une augmentation de la fréquence des événements de recombinaison chez une souche *sir2Δ*. Étant donné la structure répétitive des gènes de l'ARN ribosomal, il est possible d'émettre l'hypothèse que les cinétiques rapides de réparation observées (figures 31 et 34) sont causées par une recombinaison homologue dans ce locus suite à l'induction de dommages par les UV. La structure de la chromatine de la souche JS343 fut donc comparée à celle de la souche JS311 (type sauvage).

Les étapes d'irradiation et de préparation des noyaux furent effectuées de la même façon que précédemment. Par la suite, les préparations de noyaux des échantillons furent photo-pontées au triméthylpsoralène, l'ADN ensuite isolé et digéré avec l'enzyme de restriction *EcoRI* afin de libérer 2 fragments d'intérêts : un fragment à l'intérieur de la région transcrite de l'ADNr et le fragment correspondant à la totalité de la région intergénique. Par la suite, ces fragments furent séparés sur un gel d'agarose, transférés sur membrane par buvardage de type *Southern* et hybridés avec une sonde spécifique. Un résultat type d'une telle expérience est présenté en figure 35, tant pour le type sauvage que pour la souche JS343 (*sir2Δ*). Si la recombinaison est la cause de la réparation plus rapide, nous nous attendons à une variation de la taille du locus de l'ADNr, qui pourra être observé par cette technique. Par contre, il est important de mentionner qu'une PCR quantitative aurait pu être effectuée et est plus sensible que la technique utilisée ici. Toutefois, la PCR quantitative ne permet pas la séparation des 2 populations d'ADNr, tel que présenté ici.

Lorsque l'on observe une souche de type sauvage, environ 30% de l'ADNr est sous forme ouverte avant l'irradiation (Figure 35A, JS311 –UV cercle vert). Par la suite, l'ADNr ouvert s'accumule sous la forme fermée suite à l'irradiation pour s'ouvrir à nouveau suite à la réparation à un ratio final de 40% d'ADNr ouvert après 4h. Cette observation s'applique tout autant pour la souche JS343, où le ratio final est d'environ 30% d'ADNr ouvert après 4h. De plus, la région intergénique de la souche JS343 présente, tout au long des temps de réparation analysés, une structure nucléosomale.

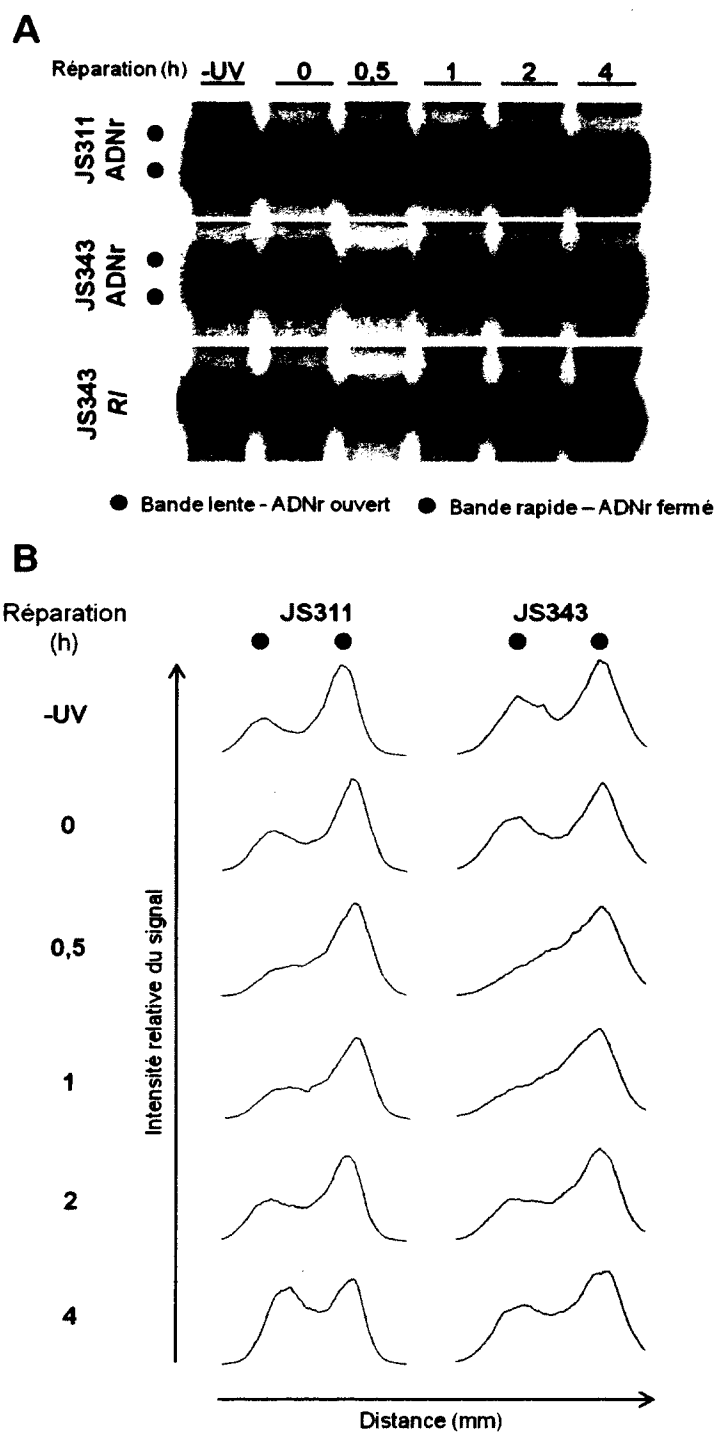


Figure 35 : Structure de la chromatine des gènes de l'ARNr des souches JS311 et JS343 (*sir2Δ*). (A) Une fois les noyaux isolés préalablement (-UV) ou suite à une exposition à 180 J/m² UVc et à une incubation en milieu de culture (0, 0,5, 1, 2 et 4h), les 2 fractions d'ADNr (ouvert, cercle vert; fermé, cercle rouge) furent séparées par photo-pontage au triméthylpsoralène, digérées par *EcoRI* et séparées sur gel d'agarose. Les résultats types suite à une hybridation avec une séquence de la région transcrite du gène sont présentés dans les 2 panneaux du haut. L'hybridation avec la région intergénique (RI) de la souche JS343 est présentée en tant que contrôle et provient du même gel que celui du haut. (B) Profil des résultats pour l'ADNr présentés en

A. Le type sauvage JS311 à gauche et JS343 à droite. Les cercles verts et rouges représentent les bandes d'ADNr ouvert et fermé.

4.2.4 Analyse de l'impact de la délétion de *SIR2* sur la réparation de la région intergénique de l'ADNr.

Dans les expériences précédentes, l'analyse des cinétiques de réparation était effectuée à l'intérieur de la région transcrite des gènes ribosomiaux. Toutefois, la protéine Sir2p est recrutée au niveau de la région initiateur de la transcription (TIR) et au niveau de la barrière de la fourche de réplication. Ces régions sont situées dans la région intergénique de l'ADNr. Conséquemment, l'impact de la délétion de *SIR2* fut analysé au niveau de la région intergénique de l'ADNr afin d'évaluer si l'impact de la délétion était limité à la région transcrite de l'ADNr. Pour ce faire, les souches JS311 et JS343 furent irradiées de même façon que décrit précédemment et l'ADN fut directement isolé avant d'effectuer une digestion avec *EcoRI* et d'effectuer les traitements à l'endonucléase V du phage T4 afin de cliver en amont des CPD. Par la suite, la migration sur gel dénaturant ainsi que les techniques subséquentes furent effectuées telles que décrites antérieurement afin d'obtenir les résultats présentés en figure 36. Les cinétiques de réparation de la souche JS311 ont été effectuées grâce à un triplicata expérimental.

Dans un premier temps, la réparation du fragment de la RI est similaire à celle observée au niveau de l'ADNr fermé ainsi qu'aux courbes de cinétiques de la RI présentées au chapitre 1, figure 3. La similarité de la réparation entre l'ADNr fermé et la RI s'explique du fait que ces régions sont, toutes deux, principalement réparées par la GG-NER. Du côté de la souche JS343 (*sir2Δ*), il semblerait que la réparation de la région intergénique s'effectue de façon plus rapide que chez la souche sauvage. En effet, après 2h de réparation, *sir2Δ* présente une réparation plus importante que chez JS311, et ce, même après 4h de réparation (*sir2Δ* : 62,6% après 2 heures de réparation. JS311 : 58,7% après 4 heures. Tableau 11). Malgré le fait que cette analyse ne fut effectuée qu'une seule fois, il semblerait que la souche *sir2Δ* répare plus rapidement la RI, ce qui est conséquent avec l'hypothèse d'une réparation rapide liée au niveau d'acétylation des histones.

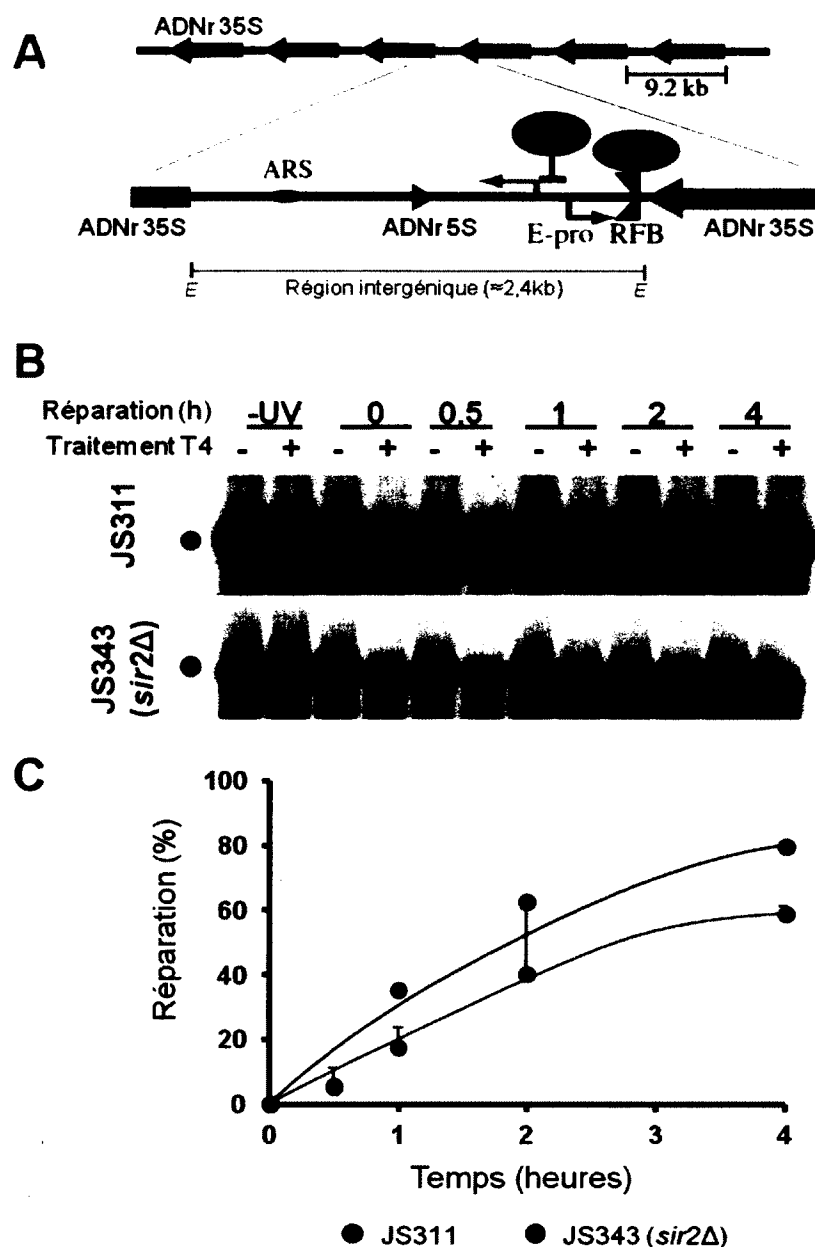


Figure 36 : Courbes de réparation de la région intergénique (RI) de l'ADNr chez JS311 et JS343 (*sir2Δ*). (A) Schématisation de la fin d'un gène de l'ARN ribosomal suivit du début d'un autre. La région intergénique correspond à la section entre la fin de la transcription d'un gène et le début de la transcription du gène subséquent (transcription: flèche orange). Le fragment de la région analysée, correspondant à la quasi-totalité de la RI et du gène 5S de l'ADNr, fut obtenu par digestion *EcoRI* (E) et la sonde utilisée correspond à cette séquence entière (barre grise). La région E-pro, dont la transcription est inhibée par Sir2p, est définie en rouge. La *replication fork barrier* (RFB), où Fob1p se lie (en bleu), empêche les collisions entre l'ARNPI et les fourches de réplifications issues de l'origine de répllication (ARS) lors de la répllication de l'ADNr. [Image traduite et adaptée de Kobayashi, 2011]. (B) Résultat type, suite à l'irradiation de la souche JS311 et JS343 (*sir2Δ*). La bande d'intérêt de chaque gel est identifiée par un cercle (vert, JS311; rouge JS343). (C) Courbes de réparation pour la RI, les barres d'erreurs correspondent à 3 expériences pour la souche JS311 et une seule expérience fut effectuée pour la souche JS343.

Tableau 11 : Résultats de la cinétique de réparation de la RI de l'ADNr chez JS311 et JS343.

Temps (h)	JS311	JS343
0	0	0,0
0,5	5,6 ± 5,7	5,0
1	17,3 ± 6,6	35,3
2	40,1 ± 20,4	62,6
4	58,7 ± 2,6	79,5

5. Discussion

Des travaux présentés dans cette thèse, trois grandes questions furent abordées et présentées sous la forme d'un chapitre pour chacune d'elles. En fait, ces questions peuvent se résumer en une question globale : Quel est l'impact du contexte transcriptionnel et chromatinien sur la réparation? Selon la structure de la chromatine, le rôle de *RAD4* et *RAD34* fut clarifié (chapitre 1). Aussi fut abordé l'impact des lésions sur la transcription et la structure de la chromatine (chapitre 2). De plus, l'ADNr possède l'avantage de permettre l'analyse concomitante d'une structure nucléosomale et non-nucléosomale. Cet aspect particulier fut utilisé afin d'évaluer l'impact de l'acétylation des nucléosomes sur les cinétiques de réparation (chapitre 3).

5.1 Quel est l'impact réel des gènes *RAD4* et *RAD34* au niveau de la NER des gènes ribosomaux?

Cette section ajoute certains aspects et sont en lien avec la discussion de l'article présenté au chapitre 1.

Le locus des gènes de l'ARNr est particulièrement utile afin d'étudier l'impact des diverses structures de la chromatine sur la NER. En effet, l'existence des deux populations d'ADNr permet d'évaluer si la présence ou l'absence de nucléosomes affecte l'accessibilité des dommages envers la machinerie de réparation. L'un des aspects intéressant de ce locus était le fait que la TC-NER y est présente chez la levure, à l'opposé de chez l'humain ou le hamster (Christians & Hanawalt, 1994; Conconi *et al*, 2002; Hanawalt & Spivak, 2008). En prenant en considération les travaux précédents du groupe de recherche du Dr. Brouwer, où ils démontrèrent que, malgré la délétion du gène *RAD4*, une réparation résiduelle de l'ADNr était toujours détectable et d'environ 50% après 2 heures (Verhage *et al*, 1996), il était possible d'émettre l'hypothèse que la TC-NER de l'ADNr n'est pas dépendante de *RAD4*. Ces résultats purent être reproduits avec notre souche *rad4Δ* (Chapitre 1, figure 1)

et, suite à la séparation des deux populations d'ADNr, il a été possible de confirmer que la TC-NER par la pARN-I n'était pas dépendante de *RAD4* (Chapitre 1, figure 2E). Contrairement à l'humain, où l'inactivité de XPC cause une inhibition totale de la GG-NER (et non de la TC-NER), la délétion de *RAD4* cause une inhibition quasi-totale de la NER, puisque seule la TC-NER par la pARN-I semble être en mesure de fonctionner chez une levure de type *rad4Δ*. De plus, la vitesse à laquelle le BT actif est réparé est augmenté par rapport au type sauvage (Chapitre 1, comparez WT et *rad4Δ*, figure 2E et 4C).

La plus grande vitesse de réparation du BT actif chez *rad4Δ* est d'un intérêt particulier. Cela peut s'expliquer par le fait que la détection des dommages par *RAD34* n'est pas l'élément limitant la vitesse de réparation. En effet, lors de la délétion de *RAD4*, il y a une plus grande disponibilité des protéines impliquées dans la NER, puisque la seule région réparée semble être le BT actif de l'ADNr. Par conséquent, si la détection des dommages était une étape limitante, il n'y aurait pas augmentation de la vitesse de réparation. Toutefois, il est possible que la délétion de *RAD4* cause une augmentation de la quantité du complexe fonctionnel Rad34/23/33 qui aura pour effet d'augmenter la vitesse de détection des dommages (et donc de réparation). Cette possibilité provient du fait que tant *RAD4* et *RAD34* sont présents dans un complexe contenant les mêmes sous-unités (à titre de rappel, les complexes sont : Rad4/23/33 et Rad34/23/33). Les analyses du chapitre 1 n'ont pas considéré les quantités relatives de ces divers complexes suite à une délétion de *RAD4* ou *RAD34*. Il serait donc intéressant d'évaluer la quantité globale du complexe Rad34/23/33 en présence et en absence de *RAD4*.

De plus, les résultats du chapitre 1 ont aussi démontré que la TC-NER de l'ADNr semble débiter environ 40 nucléotides après le site d'initiation de la transcription (Chapitre 1, figure 4C). Étrangement, malgré le fait que cette région est transcrite, elle ne semble pas être réparée par TC-NER. Tel que mentionné précédemment, lorsque la pARN-I s'échappe du promoteur et devient compétente à l'élongation, le dimère Spt4/5p phosphorylé, qui est un facteur d'élongation, est recruté à la pARN-I. Ce recrutement s'effectue grâce à l'interaction directe entre le complexe Spt4/5p, Rrn3p et un brin d'ARNr d'une longueur minimale de 18 nucléotides, ce qui induit le relargage de Rrn3p de la pARN-I (voir figure

16c). Conséquemment, il est possible d'émettre certaines hypothèses afin d'expliquer le délai de 40 nucléotides :

1. La protéine Rrn3p couvre une région importante nécessaire à l'interaction entre la pARN-I et les protéines impliquées dans la TC-NER.
2. La présence de Spt4/5 sur la pARN-I est nécessaire à la TC-NER.
3. La présence d'un ARN est nécessaire à l'interaction entre la pARN-I et les protéines impliquées dans la TC-NER.
4. La torsion conférée à la double-hélice d'ADN due à la forte transcription par les pARN-I serait nécessaire afin de permettre la détection des dommages par le complexe de TC-NER.
5. La pARN-I forme un complexe stable avec l'ADN et les facteurs de transcription au promoteur. Étant donné qu'il a été démontré que ce complexe protège (de la DNase I) une région d'ADN allant jusqu'au nucléotide +18 sur le brin transcrit (Bateman *et al*, 1985), il est possible de postuler que la pARN-I présente au promoteur inhibe l'accès à la machinerie de réparation jusqu'à environ 40 nucléotides.

Ces hypothèses peuvent être vérifiées par diverses méthodes. Premièrement, afin de vérifier l'impact de Rrn3p sur la TC-NER (hypothèse #1), il est possible d'utiliser des souches de levure où cette protéine est constitutivement fusionnée à la pARN-I (Chédin *et al*, 2007). En utilisant cette souche, nommée souche CARA (« *Constitutive Association of Rrn3 and A43* »), et en effectuant de nouveau des expériences d'analyse de réparation au niveau de la région de l'initiation de la transcription (tel que présenté dans la figure 4C du chapitre 1), il serait possible d'évaluer si la présence de Rrn3p inhibe ou non la TC-NER. Deuxièmement, afin d'évaluer l'impact des protéines Spt4/5, il est possible d'utiliser des souches où l'activité de ces facteurs sur la transcription par la pARN-I est partiellement

affectée par des mutations ponctuelles (Anderson *et al*, 2011), puisque ces gènes sont essentiels, et d'effectuer des analyses de réparation. De plus, la possibilité d'une interaction entre la pARN-I, Spt4/5 et Rm3 avec les protéines de la NER peut être analysée par FISH et par FRET (hypothèses #1 et #2). Troisièmement, il est possible d'effectuer une délétion des protéines accessoires de la pARN-I afin d'évaluer leur nécessité au niveau de la TC-NER. Plusieurs de ces délétions seront d'une utilité importante afin d'évaluer les hypothèses mentionnées ci-haut. Par exemple, la délétion du gène *RPA12* cause un défaut de terminaison en 3'. Chez une souche *rpa12Δ*, la pARN-I transcrit au-delà du site de terminaison normal pour aller terminer la transcription au RFB. Cette transcription s'effectue sans production d'ARN au niveau de la pARN-I tel que l'ont observé les travaux du groupe du Dr. Proudfoot (Prescott *et al*, 2004). Conséquemment, si la TC-NER dépendante de pARN-I nécessite un ARN (hypothèse #3), l'analyse de la réparation dans la région de la terminaison chez *rpa12Δ* aborderait cette hypothèse. De plus, la délétion de *RPA34* permettrait d'évaluer la possibilité qu'une torsion importante de l'ADN soit nécessaire pour la TC-NER (hypothèse #4). Rpa34p étant nécessaire afin surmonter les contraintes topologiques imposées à l'ADNr lors de la transcription, l'analyse de la TC-NER lors de sa délétion pourrait amener certaines informations, tout comme la délétion de la topoisomérase I, impliquée au niveau de l'ADNr. La dernière hypothèse postulée laisse supposer un mécanisme différent de reconnaissance des dommages. Car dans un tel cas, la pARN-I ne faciliterait pas la réparation, mais l'inhiberait plutôt dans la région promotrice pourtant transcrite, ce qui n'est pas cohérent avec l'hypothèse d'une interaction directe entre la pARN-I et le mécanisme de TC-NER dans les gènes ribosomiaux. Conséquemment, le mécanisme de TC-NER reste à définir et est le sujet des prochains paragraphes.

Le modèle actuel présente le complexe Rad34/23/33 comme étant l'un des éléments nécessaires à l'induction de la TC-NER. Par contre, aucune interaction entre ce complexe et la pARN-I n'a été démontrée, comparativement aux analyses portant sur Rad26p (nécessaire à la TC-NER de la pARN-II). En fait, les analyses de réparation effectuées dans le chapitre 1 ne peuvent permettre d'affirmer que la réparation due à *RAD34* soit dépendante de la transcription elle-même, car la transcription par la pARN-I n'a pas été inhibée précédant (et suite à) l'induction de lésions. Conséquemment, il est possible que la

réparation due à *RAD34* procède d'une façon différente que celle présentée dans le modèle en figure 38.

En fait, certaines observations laissent présager la possibilité que le complexe Rad34/23/33 soit impliqué au niveau de la NER d'une façon relativement similaire à celle du complexe Rad4/23/33 tout en tenant compte de certaines différences au niveau des structures de chromatines affectées par ces deux complexes :

- Les protéines encodées par les gènes *RAD4* et *RAD34* possèdent des homologies structurelles et de séquences importantes. Ces deux protéines sont membres de la famille des protéines XPC étant donné qu'elles possèdent le domaine « *Rad4pfamA* » et possèdent une forte similarité de séquence (Den Dulk *et al*, 2005).
- Tant les protéines encodées par le gène *RAD4* ou *RAD34* sont présentes dans un complexe formé de Rad23p et Rad33p.
- Le mécanisme d'action du complexe Rad4/23/33 a été démontré par cristallographie : lors de la présence d'un dommage reconnu par la NER, ce complexe détecte la distorsion du double-brin d'ADN et s'attache en face d'un dommage sur le brin non-endommagé. Par la suite, la protéine Rad4p insérera un feuillet- β afin de repousser les bases endommagées présentes sur l'autre brin d'ADN hors de la double-hélice (Min & Pavletich, 2007). Rad34p possède les domaines permettant un mécanisme similaire, le domaine « *Rad4pfamA* ».
- La méthode par laquelle le complexe Rad4/23/33 détecte une lésion requiert une distorsion du double-brin d'ADN qui ne semble pas compatible avec la structure de l'ADNr ouvert.
- La structure de l'ADNr ouvert est particulière, puisque l'ADN est recouvert de la protéine encodée par *HMO1* et qu'il y a absence de

nucléosomes au niveau du gène. Dans cette région, la réparation de ces régions nécessite *RAD34*, et non pas *RAD4*.

Conséquemment, ces observations mènent à postuler que le complexe *Rad34/23/33* pourrait détecter la distorsion causée par une lésion au niveau de l'ADNr ouvert. Ce complexe serait en mesure de détecter les dommages au niveau des séquences d'ADN recouvertes de la protéine Hmo1p et de repousser les bases endommagées hors de la double-hélice, tout comme le complexe *Rad4/23/33*. La réparation plus rapide de l'ADNr ouvert (autant le brin transcrit que le brin non-transcrit) s'expliquerait donc par une meilleure accessibilité aux dommages par le complexe *Rad34/23/33* et non pas par une interaction entre les pARN-I et les protéines de réparation. Trois approches pouvant être effectuées dans notre laboratoire sont suggérées afin d'étudier cette hypothèse et sont sommairement présentées à la figure 37.

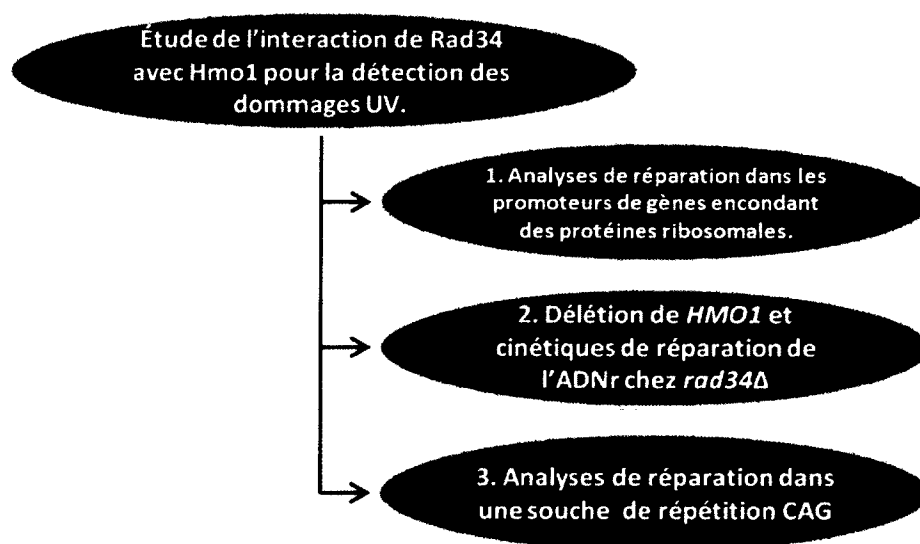


Figure 37 : Approches potentielles d'étude de l'interaction de Rad34p avec Hmo1p pour la détection des dommages UV. Trois méthodes pouvant évaluer l'hypothèse que Rad34p détecte directement les lésions lorsque Hmo1p est sur l'ADN.

La première approche est d'évaluer la réparation dans les promoteurs des gènes des protéines ribosomales (Pr). Chez environ la moitié des Pr, Hmo1p est recruté au niveau des séquences promotrices et empêche la formation de nucléosomes dans une courte région (Kasahara *et al*, 2011). Par l'analyse de la réparation dans les promoteurs des gènes RPS23A (Hmo1p présent) et RPS22B (pas d'Hmo1p) chez une souche de type sauvage et une souche *rad34Δ*, il serait possible de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse. Si *RAD34* fonctionne de façon similaire à *RAD4*, il y aura un impact négatif au niveau de la réparation de RPS23A chez *rad34Δ* et aucune différence au niveau du gène RPS22B. La seconde approche évalue la différence de réparation chez les souches *Hmo1Δ* et *Hmo1Δ-rad34Δ*. Dans ce cas, lors de l'absence de Hmo1p, la délétion de *RAD34* ne causerait pas d'effet supplémentaire au niveau des cinétiques de réparation si ce complexe est impliqué dans la reconnaissance de dommages au niveau des séquences d'ADN recouvertes de Hmo1p. Finalement, Hmo1p est aussi recruté à des séquences d'ADN comportant une structure particulière. Cette particularité peut être utilisée afin de créer artificiellement une région d'ADN non-transcrite recouverte de cette protéine et où il y a absence de nucléosome. De cette façon, il serait possible d'évaluer l'impact d'une délétion de *RAD34* dans une séquence simulant l'ADNr ouvert sans présence de pARN-I. Une telle séquence est obtenue par une répétition successive des nucléotides CAG (Kim & Livingston, 2006). Grâce à une telle approche, il serait possible d'évaluer l'effet du complexe Rad34/23/33 dans une région n'étant pas transcrite. Conséquemment, si cette région n'est plus réparée chez une souche *rad34Δ*, il serait donc possible d'affirmer que ce complexe possède un mode d'action similaire à celui du complexe Rad4/23/33.

En conclusion, l'identification précise des rôles des gènes *RAD4* et *RAD34* comme étant importants pour la réparation des séquences nucléosomales et non-nucléosomales de l'ADNr dans le chapitre 1 est d'un intérêt particulier. En plus d'avoir clarifié le rôle de ces deux protéines, les travaux présentés apportent un élément de réponse important : il est possible que la TC-NER des gènes de l'ADNr s'explique en fait par une réparation plus rapide due simplement à une meilleure accessibilité aux dommages étant donné la structure particulière de l'ADNr ouvert et non pas par une interaction entre les pARN-I et les protéines de réparation. De ce fait, l'un de ces complexes serait nécessaire à la réparation

selon le contexte de la chromatine dans la région endommagée. Finalement, ces travaux permettent d'affiner le modèle de la NER présenté précédemment en figure 23 et sont présentés en figure 38.

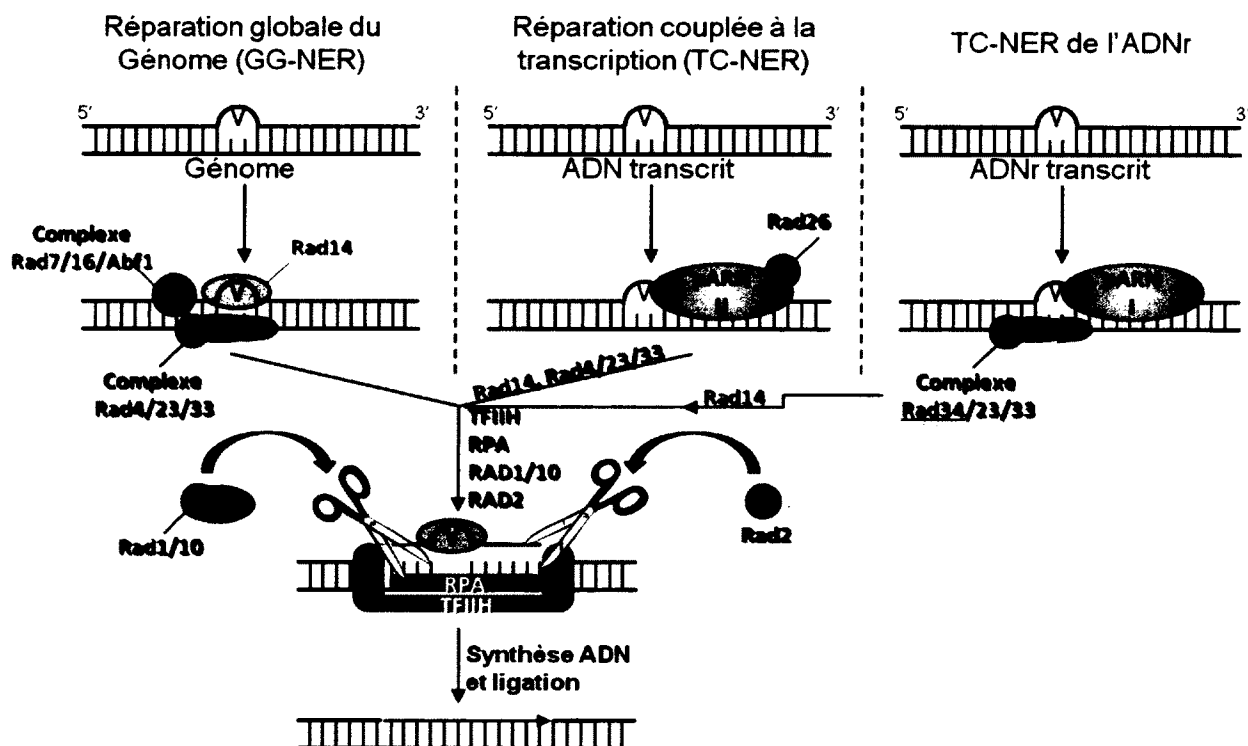


Figure 38 : Nouveau schéma des voies de réparation par excision de nucléotides. Au schéma présenté à la figure 23, la section TC-NER de l'ADNr fut ajoutée en fonction des résultats présentés dans le chapitre 1.

5.2 Qu'arrive-t-il à la polymérase à ARN I lorsqu'elle rencontre une lésion causée par les UVC?

Cette section ajoute certains aspects et sont en lien avec la discussion de l'article présenté en chapitre 2.

5.2.1 Dissociation et dégradation de la pARN-I suite à l'induction de lésions.

Les travaux présentés dans le second chapitre démontrent que, suite à une irradiation aux rayons UV, la pARN-I semble tomber rapidement du brin d'ADNr étant transcrit (voir ChIP, figure 2 du chapitre 2). Simultanément, ou subséquent, la sous-unité principale de la pARN-I, Rpa190p, est dégradée (figure 3 du chapitre 2), les analyses effectuées ne permettant pas de différencier ces deux phénomènes. Par contre, certaines informations laissent entrevoir une hypothèse plausible au niveau du déroulement temporel de ces deux étapes (dissociation et dégradation).

Chez une souche de type *rad14Δ* (aucune NER), tant les résultats de ChIP, de photopontage au psoralène que de ChEC démontrent une fermeture des gènes ribosomaux ouverts, à partir du site probable de la 1^{ère} lésion, dès 0,5h. En fait, il fut aussi observé, lors d'expériences préliminaires de ChIP analysées par PCR semi-quantitative chez un type sauvage, que la dissociation de la pARN-I s'observait dès 7,5 minutes après l'induction de lésions par UV (travaux de Geneviève Levasseur – Figure 39).

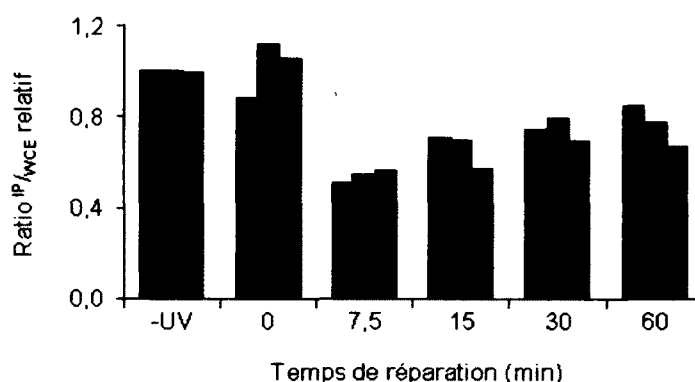


Figure 39 : Dissociation rapide de la pARN-I des gènes de l'ARN ribosomal. Ces résultats d'immunoprécipitation de la chromatine furent obtenus par PCR semi-quantitative chez une souche de type sauvage par Geneviève Levasseur. Des temps de réparation très courts furent analysés (7,5 et 15 minutes) comparativement aux travaux présentés en chapitre 2 – figure 2. Les données correspondent aux amplicons « e » (noir), « f » (rouge) et « g » (bleu) de la figure 2 du chapitre 2. Les ratios $^{IP}/_{wce}$ furent relativisés en fonction des résultats obtenus au point « -UV ». Veuillez noter que ces résultats furent obtenus par PCR semi-quantitative : les valeurs numériques obtenues ne peuvent être directement comparées avec celles obtenues par PCR quantitative.

La dissociation rapide de la pARN-I n'est pas accompagnée d'une dégradation aussi rapide de la sous-unité Rpa190p tel qu'observé par immunobuvardage (de l'ordre de 50% de dégradation après 1h, Chapitre 2 – figure 3A). Conséquemment, il est probable que la pARN-I soit dégradée suite à sa dissociation des gènes de l'ARNr. Le mécanisme signalant la dégradation de la pARN-I reste à définir. L'une des possibilités est d'analyser l'impact de la délétion de *DEF1* sur la dégradation de la pARN-I puisque le produit de ce gène est reconnu comme étant important pour causer la dégradation de la pARN-II lorsqu'elle est bloquée à un site de dommage (Woudstra *et al*, 2002). Par contre, il semble peu vraisemblable que Def1p soit impliqué, puisque ce dernier interagit directement avec Rad26p pour causer la dégradation de la pARN-II et qu'aucune interaction n'a été observée avec les protéines impliquées dans la réparation par la TC-NER des gènes ribosomaux (selon la base de donnée « *Saccharomyces Genome Database* »). De plus, il est nécessaire d'évaluer si la sous-unité Rpa190p est ubiquitinée suite à l'irradiation UV, tel que démontré chez la sous-unité Rpb1p de la pARN-II par le laboratoire du Dr. Svejstrup (Woudstra *et al*, 2002). En fait, ces analyses peuvent s'effectuer de concert chez une souche de type sauvage et *def1Δ* afin de répondre à ces deux hypothèses concomitamment.

5.2.2 Impact du chargement de nucléosomes sur l'ADNr ouvert à partir du site du 1^{er} dommage sur la TC-NER.

Le chargement de nucléosomes sur l'ADNr ouvert, la chute de la pARN-I au-delà du premier dommage et la tentative constante de transcription, laissent présager la possibilité que la TC-NER s'effectue plus rapidement au niveau de la région proximale à l'initiation de la transcription (voir modèle en figure 9 – Chapitre 2). Cette présomption provient du fait que les pARN-I entreront plus fréquemment en contact avec le 1^{er} dommage présent sur le BT ouvert qu'avec un dommage situé au-delà du 1^{er} dommage rencontré. Conséquemment, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'il existe un gradient de TC-NER à l'intérieur des gènes de l'ADNr ouverts. L'observation d'un tel phénomène appuierait fortement le modèle présenté.

Toutefois, il est possible que ce gradient n'existe pas, puisque un tel phénomène n'a pas été précédemment observé au niveau des gènes transcrits par la pARN-II. À titre d'exemple, les travaux du groupe de recherche du Dr. Waters ont démontré qu'il était difficile de corréler la quantité de transcription d'un gène et sa cinétique de réparation. Ils remarquèrent que la TC-NER est rapide au niveau du gène MET16, faiblement transcrit, par rapport au gène MET17, plus fortement transcrit (Teng *et al*, 2005). Malgré leurs observations, ces derniers soutiennent qu'il est possible que la TC-NER soit augmentée lors d'une forte transcription d'un gène, puisque leurs résultats s'appuient sur la quantité relative d'ARN_m détectée, et non pas sur les vitesses relatives d'élongation (Teng *et al*, 2005).

Par conséquent, des analyses préliminaires furent entamées afin d'évaluer l'existence d'un gradient de TC-NER au niveau de l'ADNr ouvert. Les résultats sont présentés en figure 40 et semblent démontrer que, chez une souche où la TC-NER est forte (*rad4Δ*), il est possible d'observer une réparation plus rapide d'un fragment proche de la région de l'initiation de la transcription par rapport à une région terminale. Toutefois, ces résultats ne permettent pas une analyse précise des cinétiques différentielles de réparation. Pour cette raison, une étude s'intéressant aux analyses de la TC-NER au niveau 5' et 3' grâce à une

technique comportant une résolution au nucléotide près fut planifiée pour un nouvel étudiant du laboratoire. Le projet, en cours lors de la rédaction de cette thèse, démontre clairement un gradient de réparation, ce qui appui les résultats préliminaires obtenus et présentés en figure 40.

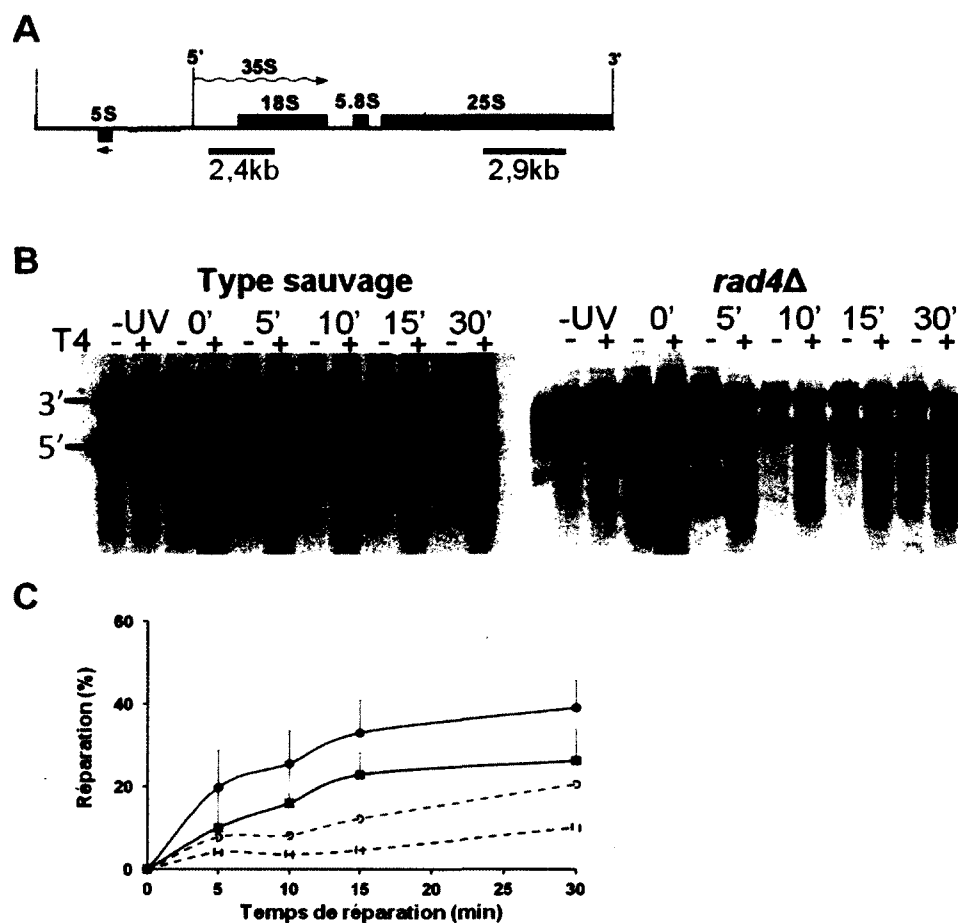


Figure 40 : Analyses de TC-NER différentielle 5' vs 3'. (A) Analyse comparative des cinétiques de réparation dans le locus de l'ADNr d'une région près du début de la transcription (de 2,4 kb, vert) et d'une région près de la terminaison (de 2,9 kb, bleu). (B) Résultat représentatif du type sauvage (effectué une fois) et de la souche *rad4Δ* (effectué trois fois) pour des temps de réparation très courts (de zéro à 30 minutes). (C) Quantification des résultats, lignes pleines pour *rad4Δ* et pointillées pour le type sauvage.

5.3 L'accessibilité aux lésions est-elle favorisée dans une structure de chromatine plus ouverte?

Depuis longtemps, les rôles régulateurs de l'acétylation des histones et du remodelage de la chromatine furent documentés. De plus, *in vivo*, la NER doit s'accommoder de la chromatine afin d'effectuer une réparation complète des dommages. Aussi, il a été proposé que des réarrangements de la chromatine survenaient durant la réparation (Meijer & Smerdon, 1999). Par exemple, la délétion de *GCN5*, une histone acétyltransférase, réduit l'efficacité de la réparation des CPD et cause ainsi une augmentation de la sensibilité aux rayons UV (Teng *et al*, 2002, 2005; Toussaint *et al*, 2006). En fait, des modifications du niveau d'acétylation des histones suite à une induction de lésion par rayons UV furent observées par le groupe de recherche du Dr. Waters. Ces modifications, indépendantes de la NER, puisqu'observées même chez des souches de type *rad4Δ* et *rad14Δ*, semblaient faciliter la réparation des dommages (Yu *et al*, 2005).

Dans un même ordre d'idée, de tels réarrangements s'opèrent au niveau de l'ADNr, où une quasi-fermeture des gènes ouverts fut précédemment observée par les travaux de notre laboratoire (Conconi *et al*, 2005). Cette fermeture des gènes ouverts, observée par la technique de photopontage au psoralène, est tout aussi indépendante de la NER, puisqu'elle fut observée chez la souche *rad14Δ*, où l'étape initiale de détection des dommages est inexistante. L'ADNr semble être un modèle particulièrement efficace pour étudier l'impact de l'acétylation des nucléosomes puisque l'impact d'une acétylation de l'ADNr nucléosomal (ADNr fermé) peut être étudié, tout en contrôlant les cinétiques de réparation des régions non-nucléosomales (ADNr ouvert) et qu'il est possible de causer une hyperacétylation de ce locus par la délétion du gène *SIR2*.

L'étude du rôle du complexe Rad7/16-Abf1p en utilisant l'ADNr comme modèle est particulièrement pertinente, puisque :

- Le complexe Rad7/16-Abf1p est partiellement responsable de la réparation de l'ADNr. En fait, le groupe de recherche du Dr. Brouwer a

émis l'hypothèse que l'ADNr actif, où il y a absence de nucléosomes, pourrait être réparé normalement en absence de ce complexe (Verhage *et al*, 1996). Son rôle concret reste à définir, puisque les deux populations d'ADNr n'ont pas été séparées précédemment.

- Le complexe Rad7/16-Abf1p affecte localement la chromatine dans une région contenant des lésions en causant une augmentation de l'acétylation des queues des histones (Modèle proposé en figure 24 de l'introduction). Ce remodelage de la chromatine faciliterait le déplacement des nucléosomes afin que la machinerie de réparation puisse avoir accès à la lésion (Yu *et al*, 2011). L'ADNr possédant tant une fraction nucléosomale que non-nucléosmale, il sera possible d'évaluer l'impact de ce complexe sur ces deux structures de façon concomitante.

Conséquemment, l'analyse de l'impact d'une délétion du gène *RAD16* au niveau de l'ADNr fut entamée. L'objectif de ce projet est de clarifier le rôle du complexe Rad7/16-Abf1p, tant au niveau de l'ADNr ouvert que fermé. Suite à la confirmation de la délétion de *RAD16* par analyse phénotypique (Figure 28), les analyses des cinétiques de réparation de l'ADNr chez *rad16Δ* démontrent que la région non-nucléosmale du brin transcrit ne nécessite pas *RAD16*. En fait, la réparation du brin transcrit (BT) ouvert s'effectue par la TC-NER dépendante de *RAD34*, tel que démontré dans le chapitre 1. De plus, la réparation par TC-NER semble partiellement requise pour la réparation du brin non-transcrit (BNT) actif, puisque ce dernier présente des cinétiques de réparation plus lente lors de la délétion de *RAD16*. Enfin, il est possible d'observer que les résultats obtenus chez la souche *rad16Δ* ressemblent à ceux de la souche *rad4Δ* (comparez la figure 30 à la figure 2E du chapitre 1). Chez ces deux souches, la GG-NER est non-fonctionnelle au niveau de l'ADNr. Conséquemment, seule la réparation par la TC-NER est observée dans ces deux cas.

De ces observations, il est possible de conclure que le complexe Rad7/16-Abf1p semble, au minimum, partiellement nécessaire à la bonne réparation du BNT ouvert, où il y

a absence de nucléosomes. Cette observation est importante puisque, selon le modèle présenté à la figure 24, le complexe Rad7/16-Abf1p cause une acétylation des queues des histones, ce qui n'est pas cohérent avec la structure de l'ADNr ouvert. Conséquemment, il est possible d'émettre certaines hypothèses afin de concilier cette observation :

- Une faible quantité d'histones résiduels pourraient être présente sur le BNT ouvert et le complexe Rad7/16-Abf1p serait requis pour acétyler les queues de ces histones et permettre ainsi une réparation normale.
- Le complexe Rad7/16-Abf1p possède une fonction additionnelle, au niveau du brin non-transcrit ouvert de l'ADNr, n'ayant pas encore été définie.

Finalement, au-delà des résultats clairs obtenus pour le BT ouvert et le BNT fermé, il est important de souligner les barres d'erreurs qui rendent les conclusions plus subtiles au niveau des impacts de la souche *rad16Δ* sur la réparation des BT fermés et BNT ouverts. Ces expériences devraient donc être répétées de nouveau afin de diminuer les marges d'erreurs avant de pouvoir être interprétées convenablement.

5.3.1 Planification de l'analyse du rôle de *RAD16* et de l'effet de l'acétylation des histones au niveau du locus de l'ADNr.

Le rôle concret du complexe Rad7/16-Abf1 restant donc à définir au niveau de l'ADNr, une étude plus poussée fut entamée afin d'évaluer l'importance de ce complexe et de ses fonctions. Étant donné que ce complexe cause une acétylation des queues des histones suite à l'irradiation aux rayons UV, l'analyse de l'impact d'une hyperacétylation du locus de l'ADNr sur la réparation et sur la nécessité de *RAD16* va permettre d'aborder le fait que *RAD16* est requis pour la réparation du BNT ouvert, pourtant non-nucléosomal, ainsi que la possibilité que *RAD16* possède d'autres rôles non-définis, tel que postulé précédemment.

Pour ce faire, une planification d'analyses préparatoires fut effectuée et ces expériences furent entamées (figure 41).

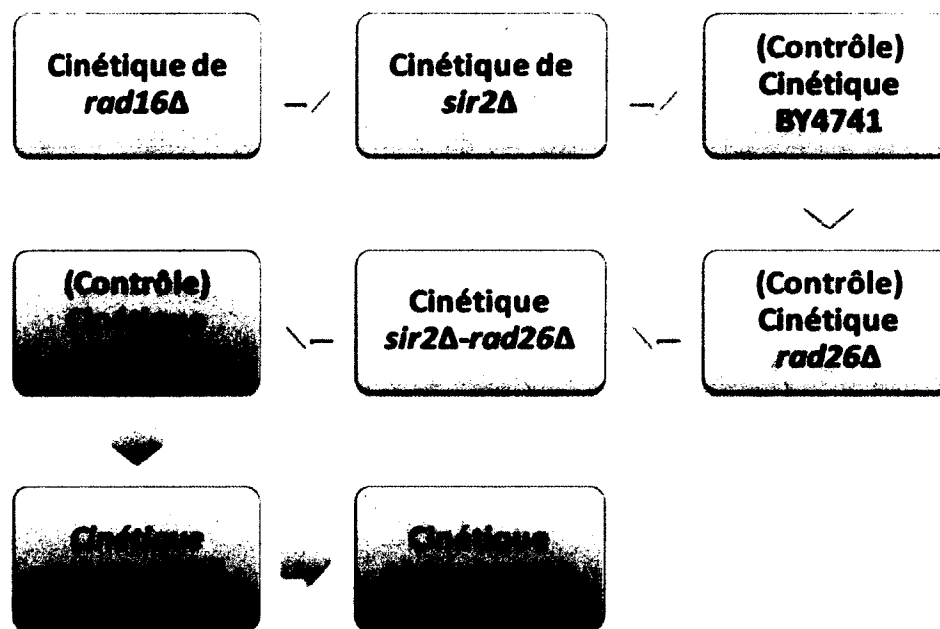


Figure 41 : Planification des analyses. Les analyses portant sur l'impact de l'acétylation sur la réparation afin de clarifier l'impact de la délétion de *RAD16* et de *SIR2* sont présentées. Les expériences complétées sont présentées dans cette thèse (en vert) et les expériences supplémentaires devant être effectuées afin de permettre l'analyse de l'impact de l'hyperacétylation des histones sur la réparation sont aussi présentées (rouge).

La possibilité d'augmenter de 3 à 5 fois l'acétylation constitutive des histones au niveau de l'ADNr par la délétion de *SIR2* est un outil efficace qui permettra d'évaluer l'impact que peut avoir l'acétylation des histones sur la réparation tout en pouvant aider à clarifier le rôle de *RAD16*. L'objectif de ces expériences est triple :

- Permettre de vérifier si l'hyperacétylation des queues des histones augmente la réparation.
- Permettre de vérifier si la réparation du BNT ouvert (non-nucléosomal) est effectuée différemment suite à l'hyperacétylation des queues des

histones. Cela laisserait donc présager la possibilité qu'il y ait présence d'histones résiduels sur ce brin d'ADN.

- Vérifier la nécessité du complexe Rad7/16-Abf1 lorsque le locus des gènes ribosomiaux est hyperacétylé. Ce complexe est-il encore nécessaire?

Toutefois, la délétion de *SIR2* présente certains effets au-delà de l'augmentation de l'acétylation, qui devront tous être évalués indépendamment avant d'effectuer les analyses de cinétique chez une souche de type *sir2Δ-rad16Δ* et sont considérés au niveau de la planification des expériences à effectuer présentées à la figure 41 (voir section 1.5.3 pour plus de détails ainsi que la section 5.3.2).

5.3.2 Analyse du rôle de *RAD16* et de l'effet de l'acétylation des histones au niveau du locus de l'ADNr.

Tel que démontré à la figure 31, la réparation chez une souche *sir2Δ* est très différente par rapport à une souche de type sauvage. La réparation plus rapide de l'ADNr observée peut s'expliquer par certains phénomènes :

1. L'augmentation de l'acétylation des queues des histones facilite la réparation par la NER.
2. La transcription par la pARN-II, normalement inhibée dans le locus de l'ADNr par *SIR2*, peut causer une augmentation de la TC-NER (dépendante de la pARN-II).
3. Une augmentation de la recombinaison du locus de l'ADNr.

Conséquemment, il est nécessaire de contrôler séparément l'effet que peuvent apporter ces phénomènes sur la NER avant même d'effectuer les analyses chez une souche de type *sir2Δ-rad16Δ*. Premièrement, l'impact de la transcription par la pARN-II (phénomène #2) pourra être analysé grâce à la délétion du gène *RAD26*. Une telle délétion affectera la TC-NER de la pARN-II et ne devrait pas affecter la TC-NER de la pARN-I (contrôles *rad26Δ* et *sir2Δ-rad26Δ*). Par la suite, l'effet de la recombinaison (phénomène #3) peut être analysé grâce à la délétion du gène *RAD52*, nécessaire à la recombinaison homologue (contrôles *rad52Δ* et *sir2Δ-rad52Δ*).

Les analyses portant sur l'impact de la transcription par la pARN-II chez une souche *sir2Δ* furent effectuées à partir d'une nouvelle souche mère (BY4741 – figure 32). La délétion de *RAD26*, nécessaire à la TC-NER des gènes transcrits par la pARN-II, ne cause pas d'effets en présence de *SIR2* (figure 33), puisque ce dernier inhibe la transcription des sites cryptiques d'initiation de la transcription de la pARN-II retrouvés dans le locus de l'ADNr. Lorsque *SIR2* est retiré, la délétion de *RAD26* ne cause pas d'effet significatif permettant d'expliquer la plus grande réparation de l'ADNr chez une souche *sir2Δ* (figure 34). Conséquemment, il est possible d'affirmer qu'à l'intérieur des régions analysées, la transcription par la pARN-II semble être très faible, puisque la TC-NER dépendante de la pARN-II n'est pas détectée, tel que démontré auparavant par d'autres travaux de recherche (Verhage *et al*, 1996; Tremblay *et al*, 2008).

Finalement, les analyses de la cinétique de réparation de souches où la recombinaison homologue est inexistante n'ont pas été conclues au fil de cette thèse et se devront d'être effectuées. Il est donc impossible d'affirmer présentement si, soit l'acétylation plus grande des queues des histones ou l'augmentation de la recombinaison homologue au niveau du locus des gènes de l'ADN ribosomal explique les cinétiques de réparation augmentées observées chez une souche *sir2Δ*. Toutefois, des analyses de la structure de la chromatine chez une souche de type sauvage et *sir2Δ* peuvent permettre d'obtenir indirectement une idée de l'impact de la délétion de *SIR2* sur la réparation par recombinaison homologue (figure 35). Étant donné que la taille du locus de l'ADNr influence le ratio d'ADNr ouvert / fermé présent, la séparation des deux populations d'ADNr suite à l'irradiation aux rayons

UV peut permettre d'évaluer si une modification importante de la taille du locus de l'ADNr s'effectue suite à l'induction de lésions chez une souche *sir2Δ*. Les analyses présentées à la figure 35 ne démontrent pas de variations importantes de la taille de l'ADNr et laissent donc supposer que le rôle de la recombinaison homologue lors de la délétion de *SIR2* semble relativement mineur. Par contre, une faible variation peut être difficile à observer à l'aide de la technique utilisée. Il serait donc nécessaire d'effectuer une analyse plus précise grâce à l'utilisation d'une amplification par PCR quantitative ainsi que d'effectuer les cinétiques de réparation chez une souche où la recombinaison est abrogée (*rad52Δ*).

En conclusion, les résultats présentés appuient donc l'hypothèse que l'augmentation de l'acétylation des queues des histones permet une réparation plus rapide de l'ADNr. En fait, la cinétique de réparation de la région intergénique, entièrement nucléosomale, (figure 36) est augmentée chez *sir2Δ*. La hausse de cinétique de réparation dans cette région est similaire à l'augmentation des cinétiques de réparation de l'ADNr inactif, nucléosomal (comparez les figures 31 et 36). De plus, le BNT ouvert est réparé légèrement plus rapidement chez une souche *sir2Δ* (figure 31), ce qui laisse présager la possibilité qu'une faible quantité d'histones H3 et H4 soit présente sur ce brin, puisque Sir2p est une HDAC affectant les queues de ces histones. Ceci est aussi compatible avec l'observation que chez une souche où le gène *RAD16* est retiré, le BNT ouvert est plus faiblement réparé (figure 30). De plus, l'impact sur la cinétique de réparation d'une souche *sir2Δ* a fait l'objet de diverses recherches au sein du laboratoire. La délétion de *SIR2* affecte toutes les régions où la protéine Sir2p effectue son rôle de HDAC de façon similaire. En effet, la réparation par la NER est augmentée au niveau de l'ADNr (travail de cette thèse), des régions télomériques « *X-element* » (travail en cours) ainsi que dans le locus du type sexuel (travail en cours) chez une souche *sir2Δ*. Au-delà de ces régions, la délétion de *SIR2* ne semble pas affecter significativement les cinétiques de réparation, ce qui renforce l'hypothèse de base stipulant qu'une augmentation de l'acétylation des histones permet une réparation plus facile par la machinerie de la NER, que ce soit par une détection des dommages améliorée ou par une plus grande facilitée à effectuer les étapes subséquentes de la réparation étant donné une plus grande accessibilité des dommages à la machinerie de réparation.

6. Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu ma famille, qui m'a soutenu tout au long de mes études à Sherbrooke. Malgré votre distance physique, vos cœurs étaient très proches. À Annie, ma conjointe, je tiens à te remercier le plus sincèrement du monde pour m'avoir appuyé moralement et scientifiquement (et techniquement!) durant ce long parcours. Ce chemin, que nous avons initié à deux, est maintenant un trajet que nous faisons en famille avec notre petite Olivia et notre prochain, qui arrivera en septembre.

Un grand merci à Antonio, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir autant aidé. Ta grande bonté fait de toi un directeur de thèse sans pareil. Les gens que j'ai eu la chance de côtoyer, au présent et par le passé, dans ce laboratoire resteront toujours gravés dans mes souvenirs (même certains stagiaires de courte durée!). À ce titre, je désire remercier spécialement les amis que j'y ai acquis : Jean-François Noël, Christian Prud'homme et Philippe Bernier-Dodier... Phil, je ne pourrai jamais te faire savoir à quel point le début de mes études à la maîtrise se serait déroulé différemment sans ton amitié. J'aimerais tant te remercier pour m'avoir ouvert l'esprit à toute l'importance de chérir les moments que j'ai avec ma fille, car on ne sait jamais lorsque notre route se terminera. Je lèverai un verre à ta santé et à la santé de tous ceux qui m'ont aidé au fil de mes études.

7. Références

- Aebi M & Hennet T (2001) Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends in cell biology* **11**: 136–41
- Aggarwal M & Brosh RM (2012) Functional analyses of human DNA repair proteins important for aging and genomic stability using yeast genetics. *DNA Repair*: In press
- Albert B, Léger-Silvestre I, Normand C, Ostermaier MK, Pérez-Fernández J, Panov KI, Zomerdijk JCBM, Schultz P & Gadal O (2011) RNA polymerase I-specific subunits promote polymerase clustering to enhance the rRNA gene transcription cycle. *The Journal of cell biology* **192**: 277–93
- Albert B, Perez-Fernandez J, Léger-Silvestre I & Gadal O (2012) Regulation of Ribosomal RNA Production by RNA Polymerase I: Does Elongation Come First? *Genetics Research International* **2012**: 1–13
- Allfrey G, Faulkner R & Mirsky AE (1964) ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **315**: 786–794
- Anderson SJ, Sikes ML, Zhang Y, French SL, Salgia S, Beyer AL, Nomura M & Schneider D a (2011) The transcription elongation factor Spt5 influences transcription by RNA polymerase I positively and negatively. *The Journal of biological chemistry* **286**: 18816–24
- Aprikian P, Moorefield B & Reeder RH (2000) TATA binding protein can stimulate core-directed transcription by yeast RNA polymerase I. *Molecular and cellular biology* **20**: 5269–75
- Aprikian P, Moorefield B & Reeder RH (2001) New Model for the Yeast RNA Polymerase I Transcription Cycle. *Molecular and cellular biology* **21**: 4847–4855
- Aragón L (2010) Ribosomal genes: safety in numbers. *Current biology* **20**: R368–70
- Archambault J & Friesen JD (1993) Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiological reviews* **57**: 703–24
- Avery O, MacLeod C & McCarty M (1944) Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *J Exp Med* **79**: 137–158

- Banditt M, Koller T & Sogo JM (1999) Transcriptional activity and chromatin structure of enhancer-deleted rRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**: 4953–60
- Bang DD, Verhage R, Goosen N, Brouwer J & Van de Putte P (1992) Molecular cloning of RAD16, a gene involved in differential repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **20**: 3925–31
- Bankmann M, Prakash L & Prakash S (1992) Yeast RAD14 and human xeroderma pigmentosum group A DNA-repair genes encode homologous proteins. *Nature* **335**: 555–558
- Banyasz A, Vayá I, Changeret-Barret P, Gustavsson T, Douki T & Markovitsi D (2011) Base Pairing Enhances Fluorescence and Favors Cyclobutane Dimer Formation Induced upon Absorption of UVA Radiation by DNA. *Journal of the American Chemical Society* **133**: 5163–5165
- Bateman E, Iida CT, Kownin P & Paule MR (1985) Footprinting of ribosomal RNA genes by transcription initiation factor and RNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 8004–8
- Batista LFZ, Kaina B, Meneghini R & Menck CFM (2009) How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutation research* **681**: 197–208
- Baxevanis a D & Landsman D (1995) The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships. *Nucleic acids research* **23**: 1604–13
- Baxevanis a D & Landsman D (1998) Histone Sequence Database: new histone fold family members. *Nucleic acids research* **26**: 372–5
- Beale L (1860) Examination of sputum from a case of cancer of the pharynx and the adjacent parts. *Arch. Med. Lond.* **2**: 44
- Becker MM & Wang Z (1989) Origin of ultraviolet damage in DNA. *Journal of molecular biology* **210**: 429–38
- Beckouet F, Labarre-Mariotte S, Albert B, Imazawa Y, Werner M, Gadal O, Nogi Y & Thuriaux P (2008) Two RNA polymerase I subunits control the binding and release of Rrn3 during transcription. *Molecular and cellular biology* **28**: 1596–605
- Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development* **12**: 142–8

- Bernardi R, Scaglioni P, Bergmann S, Horn H, Vousden K & Pandolfi P (2004) PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nature Cell Biology* **6**: 665–672
- Bespalov V, Conconi A, Zhang X, Fahy D & Smerdon MJ (2001) Improved method for measuring the ensemble average of strand breaks in genomic DNA. *Environmental and molecular mutagenesis* **38**: 166–74
- Bier M, Fath S & Tschochner H (2004) The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Letters* **564**: 41–46
- Biswas M, Maqani N, Rai R, Kumaran SP, Iyer KR, Sendinc E, Smith JS & Laloraya S (2009) Limiting the extent of the RDN1 heterochromatin domain by a silencing barrier and Sir2 protein levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **29**: 2889–98
- Blander G & Guarente L (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry* **73**: 417–35
- Blattner C, Jennebach S, Herzog F, Mayer A, Cheung ACM, Witte G, Lorenzen K, Hopfner K-P, Heck AJR, Aebersold R & Cramer P (2011) Molecular basis of Rrm3-regulated RNA polymerase I initiation and cell growth. *Genes & development* **25**: 2093–105
- Bohr V, Smith C, Okumoto D & Hanawalt P (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* **40**: 359–369
- Bonawitz ND, Chatenay-Lapointe M, Wearn CM & Shadel GS (2008) Expression of the rDNA-encoded mitochondrial protein Tar1p is stringently controlled and responds differentially to mitochondrial respiratory demand and dysfunction. *Current genetics* **54**: 83–94
- Bordi L, Cioci F & Camilloni G (2001) In vivo binding and hierarchy of assembly of the yeast RNA polymerase I transcription factors. *Molecular biology of the cell* **12**: 753–60
- Brachmann CB, Davies a, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P & Boeke JD (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast (Chichester, England)* **14**: 115–32
- Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L & Boeke JD (1995) The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes & Development* **9**: 2888–2902

- Braunstein M, Rose a B, Holmes SG, Allis CD & Broach JR (1993) Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes & Development* **7**: 592–604
- Brewer B & Fangman W (1988) A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* **55**: 637–643
- Brown S, Kellett P & Lippard S (1993) Ixr1, a yeast protein that binds to platinated DNA and confers sensitivity to cisplatin. *Science* **261**: 603–605
- Brueckner F, Hennecke U, Carell T & Cramer P (2007) CPD damage recognition by transcribing RNA polymerase II. *Science (New York, N.Y.)* **315**: 859–62
- Buttinelli M, Di Mauro E & Negri R (1993) Multiple nucleosome positioning with unique rotational setting for the *Saccharomyces cerevisiae* 5S rRNA gene in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 9315–9
- Cadet J, Sage E & Douki T (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation research* **571**: 3–17
- Carey M, Smale S & Peterson C (2009) Nuclear run-on assay. In *Transcriptional regulation in eukaryotes, concepts, strategies, and techniques*, 2nd ed pp 63–69.
- Cesarini E, Mariotti FR, Cioci F & Camilloni G (2010) RNA polymerase I transcription silences noncoding RNAs at the ribosomal DNA locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **9**: 325–35
- Chandy M, Gutiérrez JL, Prochasson P & Workman JL (2006) SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes. *Eukaryotic cell* **5**: 1738–47
- Chédin S, Laferté A, Hoang T, Lafontaine DLJ, Riva M & Carles C (2007) Is Ribosome Synthesis Controlled by Pol I transcription? *Cell Cycle* **6**: 11–15
- Chow CS, Whitehead JP & Lippard SJ (1994) HMG domain proteins induce sharp bends in cisplatin-modified DNA. *Biochemistry* **33**: 15124–30
- Christians FC & Hanawalt PC (1994) Repair in ribosomal RNA genes is deficient in xeroderma pigmentosum group C and in Cockayne's syndrome cells. *Mutation Research Letters* **323**: 179–187
- Cleaver J (1968) Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* **18**: 652–656

- Coelho PSR, Bryan AC, Kumar A, Shadel GS & Snyder M (2002) A novel mitochondrial protein, Tar1p, is encoded on the antisense strand of the nuclear 25S rDNA. *Genes & development* **16**: 2755–60
- Conconi A (2005) The yeast rDNA locus: a model system to study DNA repair in chromatin. *DNA repair* **4**: 897–908
- Conconi A, Bespalov V a & Smerdon MJ (2002) Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 649–54
- Conconi A, Paquette M, Fahy D, Bespalov VA & Smerdon MJ (2005) Repair-Independent Chromatin Assembly onto Active Ribosomal Genes in Yeast after UV Irradiation. *Molecular and cellular biology* **25**: 9773–9783
- Conconi A, Widmer RM, Koller T & Sogo JM (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* **57**: 753–761
- Crespan E, Czabany T, Maga G & Hübscher U (2012) Microhomology-mediated DNA strand annealing and elongation by human DNA polymerases λ and β on normal and repetitive DNA sequences. *Nucleic acids research*: 1–14
- Crick F & Watson JD (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* **171**: 737–738
- Dahm R (2008) Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human genetics* **122**: 565–81
- Dammann R, Lucchini R, Koller T & Sogo JM (1993) Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **21**: 2331–8
- Dammann R, Lucchini R, Koller T & Sogo JM (1995) Transcription in the yeast rDNA locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Molecular and cellular biology* **15**: 5294–5303
- Damsma GE & Cramer P (2009) Molecular basis of transcriptional mutagenesis at 8-oxoguanine. *The Journal of biological chemistry* **284**: 31658–63
- Dasgupta A, Sprouse RO, French S, Aprikian P, Hontz R, Juedes S a, Smith JS, Beyer AL & Auble DT (2007) Regulation of rRNA synthesis by TATA-binding protein-associated factor Mot1. *Molecular and cellular biology* **27**: 2886–96
- Davis AH, Reudelhuber TL & Garrard WT (1983) Varigated chromatin structures of mouse ribosomal RNA genes. *Journal of molecular biology* **167**: 133–155

- DiGiovanna JJ & Kraemer KH (2012) Shining a light on xeroderma pigmentosum. *The Journal of investigative dermatology* **132**: 785–96
- Donahue B a, Yin S, Taylor JS, Reines D & Hanawalt PC (1994) Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 8502–6
- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J & Sage E (2003) Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* **42**: 9221–6
- Drygin D, Rice WG & Grummt I (2010) The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology* **50**: 131–56
- Den Dulk B, Brandsma J a & Brouwer J (2005) The Rad4 homologue YDR314C is essential for strand-specific repair of RNA polymerase I-transcribed rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* **56**: 1518–26
- Elion E & Warner JR (1984) The major promoter element in yeast lies 2 kb upstream. *Cell* **39**: 663–673
- Elion E & Warner JR (1986) An RNA polymerase I enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **6**: 2089–2097
- Ellenberger T (2012) An arresting development in transcription. *Molecular cell* **46**: 3–4
- Ellis N a., Groden J, Ye T-Z, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M & German J (1995) The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**: 655–666
- Fahy D, Conconi A & Smerdon MJ (2005) Rapid changes in transcription and chromatin structure of ribosomal genes in yeast during growth phase transitions. *Experimental cell research* **305**: 365–73
- Ferguson LR & Philpott M (2008) Nutrition and mutagenesis. *Annual review of nutrition* **28**: 313–29
- Fernández-Tornero C, Böttcher B, Rashid UJ, Steuerwald U, Flörchinger B, Devos DP, Lindner D & Müller CW (2010) Conformational flexibility of RNA polymerase III during transcriptional elongation. *The EMBO journal* **29**: 3762–72
- Fousteri M & Mullenders LHF (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell research* **18**: 73–84

- Fousteri M, Vermeulen W, Van Zeeland A a & Mullenders LHF (2006) Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Molecular cell* **23**: 471–82
- Freeman SE, Blackett AD, Monteleone DC, Setlow RB, Sutherland BM & Sutherland JC (1986) Quantitation of radiation-, chemical-, or enzyme-induced single strand breaks in nonradioactive DNA by alkaline gel electrophoresis: Application to pyrimidine dimers. *Analytical Biochemistry* **158**: 119–129
- French SL, Osheim YN, Cioci F, Nomura M & Beyer AL (2003) In Exponentially Growing *Saccharomyces cerevisiae* Cells , rRNA Synthesis Is Determined by the Summed RNA Polymerase I Loading Rate Rather than by the Number of Active Genes. *Molecular and cellular biology* **23**: 1558–1568
- Friedberg EC (2011) Nucleotide excision repair of DNA : The very early history. *DNA Repair* **10**: 668–672
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA & Ellenberger T (2006) DNA Repair and Mutagenesis, 2nd edition. In Washington, DC: ASM Press
- Gadal O, Labarre S, Boschiero C & Thuriaux P (2002) Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *The EMBO journal* **21**: 5498–507
- Gadal O, Mariotte-Labarre S, Chedin S, Quemeneur E, Carles C, Sentenac a & Thuriaux P (1997) A34.5, a nonessential component of yeast RNA polymerase I, cooperates with subunit A14 and DNA topoisomerase I to produce a functional rRNA synthesis machine. *Molecular and cellular biology* **17**: 1787–95
- Gale JM, Nissen K a & Smerdon MJ (1987) UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 6644–8
- Gale JM & Smerdon MJ (1988) Photofootprint Chromatin of Nucleosome Core DNA in Intact Chromatin Having Different Structural States. *Journal of molecular biology* **204**: 949–958
- Garente L & Bermingham-McDonogh O (1992) Conservation and evolution of transcriptional mechanisms in eukaryotes. *Trends in Genetics* **8**: 27–32
- Georgakopoulos T & Thireos G (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *The EMBO journal* **11**: 4145–52

- Gietz R, Schiestl R, Willems A & Woods R (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast (Chichester, England)* **11**: 355–360
- Goetze H, Wittner M, Hamperl S, Hondele M, Merz K, Stoeckl U & Griesenbeck J (2010) Alternative chromatin structures of the 35S rRNA genes in *Saccharomyces cerevisiae* provide a molecular basis for the selective recruitment of RNA polymerases I and II. *Molecular and cellular biology* **30**: 2028–45
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H & Oliver SG (1996) Life with 6000 Genes. *Science* **274**: 546, 563–7
- Goldknopf IL, Taylor CW, Baum RM, Yeoman LC, Olson J, Prestayko AW & Busch H (1975) Isolation and Characterization of Protein A24, a “Histone-like” Non-Histone Chromosomal Protein. *Journal of biology* **250**: 7182–7187
- Gottlieb S & Esposito RE (1989) A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56**: 771–6
- Gottschling D, Aparicio O, Billington B & Zakian V (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **16**: 751–762
- Grant P a, Duggan L, Cote J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, Berger SL & Workman JL (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & Development* **11**: 1640–1650
- Green G & MacQuillan a M (1980) Photorepair of ultraviolet-induced petite mutational damage in *Saccharomyces cerevisiae* requires the product of the PHR1 gene. *Journal of bacteriology* **144**: 826–9
- Gregory SM & Sweder KS (2001) Deletion of the CSB homolog, RAD26, yields Spt(-) strains with proficient transcription-coupled repair. *Nucleic acids research* **29**: 3080–6
- Grunstein M, Hecht A, Fisher-Adams G, Wan J, Mann R, Strahl-Bolsinger S, Laroche T & Gasser S (1995) The regulation of euchromatin and heterochromatin by histones in yeast. *Journal of Cell Science - Supplement* **19**: 29–36
- Guzder SN, Sommers CH, Prakash L & Prakash S (2006) Complex Formation with Damage Recognition Protein Rad14 Is Essential for *Saccharomyces cerevisiae* Rad1-Rad10 Nuclease To Perform Its Function in Nucleotide Excision Repair In Vivo. *Molecular and cellular biology* **26**: 1135–1141

- Guzder SN, Sung P, Prakash L & Prakash S (1998) The DNA-dependent ATPase activity of yeast nucleotide excision repair factor 4 and its role in DNA damage recognition. *The Journal of biological chemistry* **273**: 6292–6
- Ha CW & Huh W-K (2011) Rapamycin increases rDNA stability by enhancing association of Sir2 with rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* **39**: 1336–50
- Hall DB, Wade JT & Struhl K (2006) An HMG Protein , Hmo1 , Associates with Promoters of Many Ribosomal Protein Genes and throughout the rRNA Gene Locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **26**: 3672–3679
- Hanawalt PC & Spivak G (2008) Transcription-coupled DNA repair : two decades of progress and surprises. *Molecular cell biology* **9**: 958–970
- Hara R, Selby CP, Liu M, Price DH & Sancar a (1999) Human transcription release factor 2 dissociates RNA polymerases I and II stalled at a cyclobutane thymine dimer. *The Journal of biological chemistry* **274**: 24779–86
- Harper J & Elledge S (1996) Cdk inhibitors in development and cancer. *Current opinion in genetics & development* **6**: 56–64
- Hennig W (1999) Heterochromatin. *Chromosoma* **108**: 1–9
- Heyningen V Van (1997) MODEL ORGANISMS ILLUMINATE HUMAN GENETICS AND DISEASE. *Molecular Medecine* **3**: 231–237
- Hickman M a, Froyd C a & Rusche LN (2011) Reinventing heterochromatin in budding yeasts: Sir2 and the origin recognition complex take center stage. *Eukaryotic cell* **10**: 1183–92
- Hoeijmakers JHJ (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366–374
- Hoeijmakers JHJ (2007) Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases. *Mechanisms of ageing and development* **128**: 460–2
- Hoeijmakers JHJ (2009) DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine* **361**: 1475–85
- Hontz RD, Niederer RO, Johnson JM & Smith JS (2009) Genetic identification of factors that modulate ribosomal DNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **182**: 105–19
- Horz W & Zachaud H (1980) Deoxyribonuclease II as a probe for chromatin structure : I. Location of cleavage sites. *Journal of molecular biology* **144**: 305–327

- Huang J & Moazed D (2003) Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes & Development*: 2162–2176
- Huang JC & Sancar a (1994) Determination of minimum substrate size for human excinuclease. *The Journal of biological chemistry* **269**: 19034–40
- Huang JC, Svoboda DL, Reardon JT & Sancar A (1992) Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 3664–8
- Huang Y & Maraia RJ (2001) Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic acids research* **29**: 2675–90
- Ide S, Takaaki M, Maki H & Kobayashi T (2010) Abundance of Ribosomal RNA Gene Copies Maintains Genome Integrity. *Science* **327**: 693–6
- Irizar A, Yu Y, Reed SH, Louis EJ & Waters R (2010) Silenced yeast chromatin is maintained by Sir2 in preference to permitting histone acetylations for efficient NER. *Nucleic acids research* **38**: 4675–86
- Izban MG & Luse DS (1992) Factor-stimulated RNA Polymerase II Transcribes at Physiological Elongation Rates on Naked DNA by Very Poorly on Chromatin Templates. *Journal of biological chemistry* **267**: 13647–13655
- Jackson D a, Iborra FJ, Manders EM & Cook PR (1998) Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Molecular biology of the cell* **9**: 1523–36
- Jackson SP & Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**: 1071–1078
- Jansen A & Verstrepen KJ (2011) Nucleosome Positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* **75**: 301–20
- Jenuwein T & Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)* **293**: 1074–80
- Johnson R, Prakash S & Prakash L (1999) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol eta. *Science* **12**: 1001–4
- Johnston RF, Pickett SC & Barker DL (1990) Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis* **11**: 335–360

- Jones HS, Kawauchi J, Braglia P, Alen CM, Kent N a & Proudfoot NJ (2007) RNA polymerase I in yeast transcribes dynamic nucleosomal rDNA. *Nature structural & molecular biology* **14**: 123–30
- Jowsey P a, Williams FM & Blain PG (2012) DNA damage responses in cells exposed to sulphur mustard. *Toxicology letters* **209**: 1–10
- Kasahara K, Ohtsuki K, Ki S, Aoyama K, Takahashi H, Kobayashi T, Shirahige K & Kokubo T (2007) Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **27**: 6686–705
- Kasahara K, Ohyama Y & Kokubo T (2011) Hmo1 directs pre-initiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region. *Nucleic acids research* **39**: 4136–50
- Kepes F & Schekman R (1988) The Yeast SEC53 Gene Encodes Phosphomannomutase. *Journal of biological chemistry* **263**: 9155–9161
- Keys D a, Vu L, Steffan JS, Dodd J a, Yamamoto RT, Nogi Y & Nomura M (1994) RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* **8**: 2349–2362
- Kim H & Livingston DM (2006) A high mobility group protein binds to long CAG repeat tracts and establishes their chromatin organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **281**: 15735–40
- Kim JK, Patel D & Choi BS (1995) Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochemistry and photobiology* **62**: 44–50
- Kobayashi T (2011a) Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**: 1395–403
- Kobayashi T (2011b) How does genome instability affect lifespan?: roles of rDNA and telomeres. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **16**: 617–24
- Kobayashi T & Ganley ARD (2005) Recombination regulation by transcription-induced cohesin dissociation in rDNA repeats. *Science (New York, N.Y.)* **309**: 1581–4
- Kobayashi T & Horiuchi T (1996) A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **1**: 465–74

- Kobayashi T, Horiuchi T, Tongaonkar P, Vu L & Nomura M (2004) SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast. *Cell* **117**: 441–53
- Kossel A (1911) Ueber die chemische Beschaffenheit des Zellkerns. *Munchen Med. Wochenschrift* **58**: 65–69
- Kristjuhan A & Svejstrup JQ (2004) Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *The EMBO journal* **23**: 4243–52
- Kuhn C-D, Geiger SR, Baumli S, Gartmann M, Gerber J, Jennebach S, Mielke T, Tschochner H, Beckmann R & Cramer P (2007) Functional architecture of RNA polymerase I. *Cell* **131**: 1260–72
- Kulaeva OI, Hsieh F-K & Studitsky VM (2010) RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 11325–30
- Lagerwerf S, Vrouwe MG, Overmeer RM, Fousteri MI & Mullenders LHF (2011) DNA damage response and transcription. *DNA repair* **10**: 743–50
- Lainé J-P & Egly J-M (2006) Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *The EMBO journal* **25**: 387–97
- Lalo D, Steffan JS, Dodd J a & Nomura M (1996) RRN11 encodes the third subunit of the complex containing Rrn6p and Rrn7p that is essential for the initiation of rDNA transcription by yeast RNA polymerase I. *The Journal of biological chemistry* **271**: 21062–7
- Lang W & Reeder RH (1993) The REB1 site is an essential component of a terminator for RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **13**: 649–658
- Lee S, Yu S, Prakash L & Prakash S (2002) Yeast RAD26, a Homolog of the Human CSB Gene, Functions Independently of Nucleotide Excision Repair and Base Excision Repair in Promoting Transcription through Damaged Bases. *Molecular and cellular biology* **22**: 4383–4389
- Leloup J-C & Goldbeter A (2008) Modeling the circadian clock: from molecular mechanism to physiological disorders. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **30**: 590–600
- Lepore N & Lafontaine DLJ (2011) A Functional Interface at the rDNA Connects rRNA Synthesis, Pre-rRNA Processing and Nucleolar Surveillance in Budding Yeast. *PloS one* **6**: e24962

- Lettieri T, Kraehenbuehl R, Capiaghi C, Livingstone-Zatchej M & Thoma F (2008) Functionally distinct nucleosome-free regions in yeast require Rad7 and Rad16 for nucleotide excision repair. *DNA repair* **7**: 734–43
- Van der Leun JC (2004) The ozone layer. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* **20**: 159–62
- Li B, Carey M & Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**: 707–19
- Li C, Mueller JE & Bryk M (2006a) Sir2 Represses Endogenous Polymerase II Transcription Units in the Ribosomal DNA Nontranscribed Spacer. *Molecular Biology of the Cell* **17**: 3848–3859
- Li J, Uchida T, Todo T & Kitagawa T (2006b) Similarities and differences between cyclobutane pyrimidine dimer photolyase and (6-4) photolyase as revealed by resonance Raman spectroscopy: Electron transfer from the FAD cofactor to ultraviolet-damaged DNA. *The Journal of biological chemistry* **281**: 25551–9
- Li S & Smerdon MJ (2002) Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **21**: 5921–9
- Lin CW, Moorefield B, Payne J, Aprikian P, Mitomo K & Reeder RH (1996) A novel 66-kilodalton protein complexes with Rrn6, Rrn7, and TATA-binding protein to promote polymerase I transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **16**: 6436–43
- Lin J & Blackburn EH (2004) Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. *Genes & development* **18**: 387–96
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **363**: 709–715
- Linskens M & Huberman J (1988) Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **8**: 4927–4935
- Livingstone-Zatchej M, Meier a, Suter B & Thoma F (1997) RNA polymerase II transcription inhibits DNA repair by photolyase in the transcribed strand of active yeast genes. *Nucleic acids research* **25**: 3795–800
- Lu J, Kobayashi R & Brill SJ (1996) Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast. *The Journal of biological chemistry* **271**: 33678–85
- Lucchini R & Sogo JM (1995) Replication of transcriptionally active chromatin. *Nature* **374**: 276–280

- Lucchini R, Wellinger RE & Sogo JM (2001) Nucleosome positioning at the replication fork. *The EMBO journal* **20**: 7294–302
- Lundblad V, Hartzog G & Moqtaderi Z (2001) Manipulation of cloned yeast DNA. In *Current Protocols in Molecular Biology* pp 13.10.1–13.10.14.
- Mardiros A, Benoun JM, Haughton R, Baxter K, Kelson EP & Fischhaber PL (2010) Rad10-YFP focus induction in response to UV depends on RAD14 in yeast. *Acta histochemica*: 1–7
- Marietta C & Brooks PJ (2007) Transcriptional bypass of bulky DNA lesions causes new mutant RNA transcripts in human cells. *EMBO reports* **8**: 388–93
- Mathonnet G, Leger C, Desnoyers J, Drouin R, Therrien J-P & Drobetsky E a (2003) UV wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair in p53-deficient human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 7219–24
- Matthijs G, Schollen E, Pardon E, Veiga-Da-Cunha M, Jaeken J, Cassiman JJ & Van Schaftingen E (1997a) Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature* **16**: 88–92
- Matthijs G, Schollen E, Pirard M, Budarf ML, Van Schaftingen E & Cassiman JJ (1997b) PMM (PMM1), the human homologue of SEC53 or yeast phosphomannomutase, is localized on chromosome 22q13. *Genomics* **40**: 41–7
- McA'Nulty M (1996) The HMG-domain protein Ixr1 blocks excision repair of cisplatin-DNA adducts in yeast. *Mutation Research/DNA Repair* **362**: 75–86
- McVey M & Lee SE (2008) MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in genetics* **24**: 529–38
- Mei Kwei JS, Kuraoka I, Horibata K, Ubukata M, Kobatake E, Iwai S, Handa H & Tanaka K (2004) Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoproduct. *Biochemical and biophysical research communications* **320**: 1133–8
- Meier A, Livingstone-Zatchej M & Thoma F (2002) Repair of active and silenced rDNA in yeast: the contributions of photolyase and transcription-couples nucleotide excision repair. *The Journal of biological chemistry* **277**: 11845–52
- Meier A & Thoma F (2005) RNA Polymerase I Transcription Factors in Active Yeast rRNA Gene Promoters Enhance UV Damage Formation and Inhibit Repair. *Molecular and cellular biology* **25**: 1586–1595

- Meijer M & Smerdon MJ (1999) Accessing DNA damage in chromatin: insights from transcription. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **21**: 596–603
- Mellon I, Spivak G & Hanawalt P (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* **51**: 241–249
- Mémet S, Gouy M, Marck C, Sentenac a & Buhler JM (1988) RPA190, the gene coding for the largest subunit of yeast RNA polymerase A. *The Journal of biological chemistry* **263**: 2830–9
- Merz K, Hondele M, Goetze H, Gmelch K, Stoeckl U & Griesenbeck J (2008) Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes & development* **22**: 1190–204
- Miller OL & Beatty BR (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science (New York, N.Y.)* **164**: 955–7
- Min J-H & Pavletich NP (2007) Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature* **449**: 570–5
- Mitchell DL & Nairn RS (1989) The Biology of the (6-4) Photoproduct. *Photochemistry and photobiology* **49**: 805–819
- Mitchell DL, Nguyen TD & Cleaver JE (1990) Nonrandom Induction of Pyrimidine-Pyrimidone (6-4) Photoproducts in Ultraviolet-irradiated Human Chromatin. *Journal of biological chemistry* **265**: 5353–5356
- Molenaar I, Sillevs Smith W, Rozijn T & Tonino G (1970) BIOCHEMICAL AND ELECTRON MICROSCOPIC YEAST NUCLEI STUDY OF ISOLATED. *Experimental cell research* **60**: 148–156
- Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J & Douki T (2006) Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13765–70
- Mueller JP & Smerdon MJ (1995) Repair of plasmid and genomic DNA in a rad7 delta mutant of yeast. *Nucleic acids research* **23**: 3457–64
- Muller M, Lucchini R & Sogo JM (2000) Replication of yeast rDNA initiates downstream of transcriptionally active genes. *Molecular cell* **5**: 767–77
- Nash HM, Bruner SD, Schärer OD, Kawate T, Addona T a, Spooner E, Lane WS & Verdine GL (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the

- existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Current biology* **6**: 968–80
- Ness PJ, Labhart P, Banz E, Koller T & Parish OW (1983) Chromatin Structure along the Ribosomal DNA of *Dictyostelium*. *Journal of molecular biology* **166**: 361–381
- Niggli HJ & Cerutti PA (1982) Nucleosomal distribution of thymine photodimers following far- and near-ultraviolet irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **105**: 1215–1223
- Noble JE & Bailey MJ a (2009) Quantitation of protein. 1st ed. Elsevier Inc.
- Oakes M, Nogi Y, Clark MW & Nomura M (1993) Structural alterations of the nucleolus in Structural Alterations of the Nucleolus in Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Defective in RNA Polymerase I. *Molecular and cellular biology* **13**: 2441–2455
- Olins DE & Olins AL (2003) Chromatin history: our view from the bridge. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**: 809–14
- Osheim YN, French SL, Sikes ML & Beyer AL (2008) Electron microscope visualization of RNA transcription and processing in *Saccharomyces cerevisiae* by Miller chromatin spreading. In *The Nucleus: Volume 2: Chromatin, Transcription, Envelope, Proteins, Dynamics and Imaging*, Hancock R (ed) pp 55–69. Humana Press
- Park H, Zhang K, Ren Y, Nadji S, Sinha N, Taylor J-S & Kang C (2002) Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15965–70
- Pehrson JR & Cohen LH (1992) Effects of DNA looping on pyrimidine dimer formation. *Nucleic acids research* **20**: 1321–4
- Petes TD (1979) Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 410–4
- Petes TD & Botstein D (1977) Simple Mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5091–5
- Petranovic D, Tyo K, Vemuri GN & Nielsen J (2010) Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS yeast research* **10**: 1046–59
- Pettijohn D & Hanawalt PC (1964) Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. *Journal of molecular biology* **9**: 395–410

- Peyroche G, Milkereit P, Bischler N, Tschochner H, Schultz P, Sentenac a, Carles C & Riva M (2000) The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *The EMBO journal* **19**: 5473–82
- Pfeifer GP & Besaratinia A (2012) UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochemical & photobiological sciences* **11**: 90–7
- Philippsen P, Thomas M, Kramer R a & Davis RW (1978) Unique arrangement of coding sequences for 5 S, 5.8 S, 18 S and 25 S ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae* as determined by R-loop and hybridization analysis. *Journal of molecular biology* **123**: 387–404
- Poole AM, Kobayashi T & Ganley ARD (2012) A positive role for yeast extrachromosomal rDNA circles?: Extrachromosomal ribosomal DNA circle accumulation during the retrograde response may suppress mitochondrial cheats in yeast through the action of TAR1. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **34**: 725–9
- Prakash S & Prakash L (2000) Nucleotide excision repair in yeast. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **451**: 13–24
- Prescott EM, Osheim YN, Jones HS, Alen CM, Roan JG, Reeder RH, Beyer AL & Proudfoot NJ (2004) Transcriptional termination by RNA polymerase I requires the small subunit Rpa12p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6068–73
- Preston BD, Albertson TM & Herr AJ (2011) DNA Replication Fidelity and Cancer. *Semin Cancer Biol.* **20**: 281–293
- Preston RJ (2005) RADIATION BIOLOGY : CONCEPTS FOR RADIATION PROTECTION. *Health Physics* **88**: 545–556
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD & Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593–9
- Reed SH, Akiyama M, Stillman B & Friedberg EC (1999) Yeast autonomously replicating sequence binding factor is involved in nucleotide excision repair. *Genes & development* **13**: 3052–8
- Reeder RH & Roeder R (1972) Ribosomal RNA Synthesis in Isolated Nuclei. *Journal of molecular biology* **67**: 433–441
- Reeves R (1978a) Nucleosome structure of *Xenopus* oocyte amplified ribosomal genes. *Biochemistry* **17**: 4908–4916

- Reeves R (1978b) Structure of *Xenopus* ribosomal gene chromatin during changes in genomic transcription rates. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**: 709–722
- Reich C, Zeller M, Milkereit P, Hausner W, Cramer P, Tschöchner H & Thömm M (2009) The archaeal RNA polymerase subunit P and the eukaryotic polymerase subunit Rpb12 are interchangeable in vivo and in vitro. *Molecular microbiology* **71**: 989–1002
- Reinke H & Hörz W (2003) Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Molecular cell* **11**: 1599–607
- Richards EJ & Elgin SCR (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**: 489–500
- Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ, Luger K & Ma AW (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–260
- Rine J & Herskowitz I (1987) Four Genes Responsible for a Position Effect on Expression From HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **22**: 9–22
- Rinsland CP, Boone C, Nassar R, Walker K, Bernath P, McConnell JC & Chiou L (2005) Atmospheric Chemistry Experiment (ACE) Arctic stratospheric measurements of NO_x during February and March 2004: Impact of intense solar flares. *Geophysical Research Letters* **32**: 5–8
- Rochette PJ, Therrien J-P, Drouin R, Perdiz D, Bastien N, Drobetsky E a & Sage E (2003) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Research* **31**: 2786–2794
- Rudolph CJ, Upton AL & Lloyd RG (2007) Replication fork stalling and cell cycle arrest in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Genes & development* **21**: 668–81
- Rusche LN, Kirchmaier AL & Rine J (2003) The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of biochemistry* **72**: 481–516
- Russell J & Zomerdijs JCBM (2005) RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends in biochemical sciences* **30**: 87–96
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual Second Edi. Nolan C (ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sancar A (2004) Photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. **69**: 73–100
- Sancar A (2008) Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. *The Journal of biological chemistry* **283**: 32153–7

- Sancar GB & Smith FW (1989) Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Molecular and cellular biology* **9**: 4767–76
- Van der Sande C, Kulkens T, Kramer A, De Wijs I, Van Heerikhuizen H, Klootwijk J & Planta R (1989) Termination of transcription by yeast RNA polymerase I. *Nucleic acids research* **17**: 9127–9146
- Sander M, Cadet J, Casciano D a, Galloway SM, Marnett LJ, Novak RF, Pettit SD, Preston RJ, Skare J a, Williams GM, Van Houten B & Gollapudi BB (2005) Proceedings of a workshop on DNA adducts: biological significance and applications to risk assessment Washington, DC, April 13-14, 2004. *Toxicology and applied pharmacology* **208**: 1–20
- Sandmeier JJ, French S, Osheim Y, Cheung WL, Gallo CM, Beyer AL & Smith JS (2002) RPD3 is required for the inactivation of yeast ribosomal DNA genes in stationary phase. *EMBO Journal* **21**: 4959–4968
- Sanij E & Hannan RD (2009) The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **4**: 374–82
- Scheer U, Hügler B, Hazan R & Rose KM (1984) Drug-induced Dispersal of Transcribed rRNA Genes and Transcriptional Products : Immunolocalization and Silver Staining of Different Nucleolar Components in Rat Cells Treated with 5,6-Dichloro-B-D-Ribofuranosylbenzimidazole. *Journal of cellular biology* **99**: 672–679
- Schena M (1989) The evolutionary conservation of eukaryotic gene transcription. *Experientia* **45**: 972–83
- Schmid M, Durussel T & Laemmli UK (2004) ChlC and ChEC; genomic mapping of chromatin proteins. *Molecular cell* **16**: 147–57
- Schneider DA (2012) RNA polymerase I activity is regulated at multiple steps in the transcription cycle: Recent insights into factors that influence transcription elongation. *Gene* **493**: 176–184
- Schneider DA, French SL, Osheim YN, Bailey a O, Vu L, Dodd J, Yates JR, Beyer AL & Nomura M (2006) RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 12707–12
- Schneider DA & Nomura M (2004) RNA polymerase I remains intact without subunit exchange through multiple rounds of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15112–7

- Selby CP & Sancar a (1994) Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline. *Microbiological reviews* **58**: 317–29
- Selth L a, Sigurdsson S & Svejstrup JQ (2010) Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Annual review of biochemistry* **79**: 271–93
- Setlow RB & Carrier W (1964) The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**: 226–231
- Shiio Y & Eisenman RN (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13225–30
- Shilatifard A (2006) Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual review of biochemistry* **75**: 243–69
- Shinohara a, Ogawa H & Ogawa T (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* **69**: 457–70
- Shou W, Seol JH, Shevchenko a, Baskerville C, Moazed D, Chen ZW, Jang J, Charbonneau H & Deshaies RJ (1999) Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* **97**: 233–44
- Shpakovski G V, Acker J, Wintzerith M, Lacroix JF, Thuriaux P & Vigneron M (1995) Four subunits that are shared by the three classes of RNA polymerase are functionally interchangeable between *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **15**: 4702–10
- Siddiqi IN, Dodd JA, Vu L, Eliason K, Oakes ML, Keener J, Moore R, Young MK & Nomura M (2001) Transcription of chromosomal rRNA genes by both RNA polymerase I and II in yeast *uaf30* mutants lacking the 30 kDa subunit of transcription factor UAF. *EMBO Journal* **20**: 4512–4521
- Sikorski RS & Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19–27
- Skryabin K, Eldarov M, Larionov V, Bayev A, Klootwijk J, De Regt V, Veldman G, Planta R, Georgiev O & Hadjiolov A (1984) Structure and function of the nontranscribed spacer regions of yeast rDNA. *Nucleic acids research* **12**: 2955–2968
- Smerdon MJ & Conconi A (1998) Modulation of DNA damage and DNA repair in chromatin. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **62**: 227–255

- Smerdon MJ & Thoma F (1990) Site-specific DNA repair at the nucleosome level in a yeast minichromosome. *Cell* **61**: 675–84
- Smith JS & Boeke JD (1997) An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes & Development* **11**: 241–254
- Smith JS, Caputo E & Boeke JD (1999) A genetic screen for ribosomal DNA silencing defects identifies multiple DNA replication and chromatin-modulating factors. *Molecular and cellular biology* **19**: 3184–97
- Sogo JM, Ness PJ, Widmer RM, Parish RW & Koller T (1984) Psoralen-crosslinking of DNA as a probe for the structure of active nucleolar chromatin. *Journal of molecular biology* **178**: 897–919
- Sogo JM & Thoma F (2003) The Structure of rDNA Chromatin. In *The Nucleolus*
- Somesh BP, Reid J, Liu W-F, Sogaard TMM, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Svejstrup JQ (2005) Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* **121**: 913–23
- Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI & Moss T (2006) Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Molecular cell* **21**: 629–39
- Straight a F, Shou W, Dowd GJ, Turck CW, Deshaies RJ, Johnson a D & Moazed D (1999) Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* **97**: 245–56
- Studitsky VM, Clark DJ & Felsenfeld G (1994) A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template. *Cell* **76**: 371–382
- Sun J-Q, Hatanaka A & Oki M (2011) Boundaries of transcriptionally silent chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & genetic systems* **86**: 73–81
- Sung P, Bailly V, Weber C, Thompson L, Prakash L & Prakash S (1993) Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature* **365**: 852–855
- Suquet C, Mitchell DL & Smerdon MJ (1995) Repair of UV-induced (6-4) Photoproducts in Nucleosome Core DNA. *Journal of biological chemistry* **270**: 16507–16509
- Suquet C & Smerdon MJ (1993) UV Damage to DNA Strongly Influences Its Rotational Setting of on the Histone Surface of Reconstituted Nucleosomes. *Biological Chemistry* **268**: 23755–23757

- Sutherland BM & Shih a G (1983) Quantitation of pyrimidine dimer contents of nonradioactive deoxyribonucleic acid by electrophoresis in alkaline agarose gels. *Biochemistry* **22**: 745–9
- Symington LS (2002) Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiology and molecular biology reviews* **66**: 630–670
- Symington LS & Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual review of genetics* **45**: 247–71
- Taddei A, Schober H & Gasser SM (2010) The Budding Yeast Nucleus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*
- Takeuchi Y, Horiuchi T & Kobayashi T (2003) Transcription-dependent recombination and the role of fork collision in yeast rDNA. *Genes & Development* **17**: 1497–1506
- Tanner KG, Landry J, Sternglanz R & Denu JM (2000) Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 14178–82
- Tanny JC, Dowd GJ, Huang J, Hilz H & Moazed D (1999) An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. *Cell* **99**: 735–45
- Taylor SS (1982) The in Vitro Phosphorylation of Chromatin by the Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase. *Journal of biological chemistry* **257**: 6056–6063
- Teng Y, Yu Y, Ferreiro J a & Waters R (2005) Histone acetylation, chromatin remodelling, transcription and nucleotide excision repair in *S. cerevisiae*: studies with two model genes. *DNA repair* **4**: 870–83
- Teng Y, Yu Y & Waters R (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* histone acetyltransferase Gcn5 has a role in the photoreactivation and nucleotide excision repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene. *Journal of molecular biology* **316**: 489–99
- Thoma F (2005) Repair of UV lesions in nucleosomes--intrinsic properties and remodeling. *DNA repair* **4**: 855–69
- Tornaletti S (2009) DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. *Cellular and molecular life sciences* : *CMLS* **66**: 1010–20

- Tornaletti S, Donahue B a, Reines D & Hanawalt PC (1997) Nucleotide sequence context effect of a cyclobutane pyrimidine dimer upon RNA polymerase II transcription. *The Journal of biological chemistry* **272**: 31719–24
- Tornaletti S & Hanawalt PC (1999) Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* **81**: 139–46
- Toussaint M & Conconi A (2006) High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents. *Nature protocols* **1**: 1922–8
- Toussaint M, Levasseur G, Gervais-Bird J, Wellinger RJ, Elela SA & Conconi A (2006) A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. *Mutation research* **606**: 92–105
- Toussaint M, Levasseur G, Tremblay M, Paquette M & Conconi A (2005) Psoralen photocrosslinking , a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I - transcribed ribosomal genes 1. *Biochemical and Cellular Biology* **83**: 449–459
- Tremblay M, Teng Y, Paquette M, Waters R & Conconi A (2008) Complementary roles of yeast Rad4p and Rad34p in nucleotide excision repair of active and inactive rRNA gene chromatin. *Molecular and cellular biology* **28**: 7504–13
- Tremblay M, Toussaint M, D'Amours A & Conconi A (2009) Nucleotide excision repair and photolyase repair of UV photoproducts in nucleosomes : assessing the existence of nucleosome and non-nucleosome rDNA chromatin in vivo. *Biochemical and Cellular Biology* **346**: 337–346
- Turesky RJ (2007) Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology letters* **168**: 219–27
- Tyrrell RM (1973) INDUCTION OF PYRIMIDINE DIMERS IN BACTERIAL DNA BY 365 nm RADIATION. *Photochemistry and photobiology* **17**: 69–73
- Verhage R a, Van de Putte P & Brouwer J (1996) Repair of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: RAD4-independent strand-specific nucleotide excision repair of RNA polymerase I transcribed genes. *Nucleic acids research* **24**: 1020–5
- Verhage R, Zeeman a M, De Groot N, Gleig F, Bang DD, Van de Putte P & Brouwer J (1994) The RAD7 and RAD16 genes, which are essential for pyrimidine dimer removal from the silent mating type loci, are also required for repair of the nontranscribed strand of an active gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **14**: 6135–42
- Viktorovskaya O V, Appling FD & Schneider DA (2011) Yeast transcription elongation factor SPT5 associates with RNA polymerase I and RNA polymerase II directly. *The Journal of biological chemistry* **286**: 18825–18833

- Vogelauer M, Cioci F & Camilloni G (1998) DNA protein-interactions at the *Saccharomyces cerevisiae* 35 S rRNA promoter and in its surrounding region. *Journal of molecular biology* **275**: 197–209
- Wach A, Brachat A, Pöhlmann R & Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793–808
- Walmacq C, Cheung ACM, Kireeva ML, Lubkowska L, Ye C, Gotte D, Strathern JN, Carell T, Cramer P & Kashlev M (2012) Mechanism of Translesion Transcription by RNA Polymerase II and Its Role in Cellular Resistance to DNA Damage. *Molecular Cell* **46**: 18–29
- Warner JR (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences* **24**: 437–40
- Watson JD & Crick F (1953) Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* **171**: 964–967
- Werner M, Thuriaux P & Soutourina J (2009) Structure-function analysis of RNA polymerases I and III. *Current opinion in structural biology* **19**: 740–5
- White CL, Suto RK & Luger K (2001) Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *The EMBO journal* **20**: 5207–18
- Widmer RM, Lucchini R, Meyer B, Sogo JM, Edstrom J & Koller T (1984) Chromatin structure of a hyperactive secretory protein gene (in Balbiani ring 2) of *Chironomus*. *EMBO Journal* **3**: 1635–1641
- Wiesendanger B, Lucchini R, Koller T & Sogo JM (1994) Replication fork barriers in the *Xenopus* rDNA. *Nucleic acids research* **22**: 5038–46
- Wittner M, Hamperl S, Stöckl U, Seufert W, Tschochner H, Milkereit P & Griesenbeck J (2011) Establishment and maintenance of alternative chromatin states at a multicopy gene locus. *Cell* **145**: 543–54
- Workman JL (2006) Nucleosome displacement in transcription. *Genes & development* **20**: 2009–17
- Woudstra EC, Gilbert C, Fellows J, Jansen L, Brouwer J, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Svejstrup JQ (2002) A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature* **415**: 929–33

- Yamamoto RT, Nogi Y, Dodd J a & Nomura M (1996) RRN3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *The EMBO journal* **15**: 3964–73
- Yang C, Lambie E, Hardin J, Craft J & Snyder M (1989) Higher order structure is present in the yeast nucleus: autoantibody probes demonstrate that the nucleolus lies opposite the spindle pole body. *Chromosoma* **98**: 123–128
- Yoon JH, Lee CS, O'Connor TR, Yasui a & Pfeifer GP (2000) The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *Journal of molecular biology* **299**: 681–93
- Yu S, Owen-Hughes T, Friedberg EC, Waters R & Reed SH (2004) The yeast Rad7/Rad16/Abf1 complex generates superhelical torsion in DNA that is required for nucleotide excision repair. *DNA repair* **3**: 277–87
- Yu S, Smirnova JB, Friedberg EC, Stillman B, Akiyama M, Owen-Hughes T, Waters R & Reed SH (2009) ABF1-binding sites promote efficient global genome nucleotide excision repair. *The Journal of biological chemistry* **284**: 966–73
- Yu S, Teng Y, Waters R & Reed SH (2011) How Chromatin Is Remodelled during DNA Repair of UV-Induced DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics* **7**: e1002124
- Yu Y, Teng Y, Liu H, Reed SH & Waters R (2005) UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8650–5
- Zhang Y, Sikes ML, Beyer AL & Schneider DA (2009) The Paf1 complex is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 2153–8
- Zhang Y, Smith AD, Renfrow MB & Schneider D a (2010) The RNA polymerase-associated factor 1 complex (Paf1C) directly increases the elongation rate of RNA polymerase I and is required for efficient regulation of rRNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* **285**: 14152–9
- Zhou Y & Martin CT (2006) Observed instability of T7 RNA polymerase elongation complexes can be dominated by collision-induced “bumping”. *The Journal of biological chemistry* **281**: 24441–8